

Denise Chiareli

**CONTROLE DA LEPTOSPIROSE EM BOVINOS DE LEITE COM
VACINA AUTÓCTONE EM SANTO ANTÔNIO DO MONTE, MG,
2007/2010**

Tese apresentada a Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal

Área de Concentração: Epidemiologia e Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Élvio Carlos Moreira

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária - UFMG
2011**

C532c Chiareli, Denise, 1981-
Controle da leptospirose em bovinos de leite com vacina autóctone em
Santo Antônio do Monte, MG, 2007/2010 / Denise Chiareli. – 2011.
p. 44 : il.

Orientador: Élvio Carlos Moreira
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais,
Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Bovino de leite – Doenças – Teses. 2. Leptospirose em animais –
Teses. 3. Leptospirose – Vacina – Teses. I. Moreira, Élvio Carlos.
II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.214 089 69

Tese defendida e aprovada em 28 de abril de 2011, pela Comissão Examinadora constituída por:



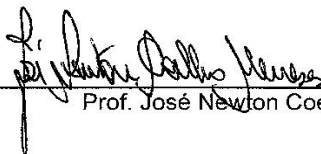
Prof. Élvio Carlos Moreira
Orientador



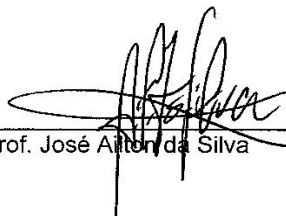
Prof. José Lúcio dos Santos



Prof. Francisco Cecílio Viana



Prof. José Newton Coelho Meneses



Prof. José Altair da Silva

DEDICATÓRIA

Àqueles que sempre estiveram ao meu lado, apoiando-me incondicionalmente: meus queridos pais Luiz e Vera, minhas queridas avós Aparecida e Conceição, meus queridos irmãos Gustavo e Cacá.

Àquele que me apoiou diariamente com muito amor, compreensão, dedicação e incentivo, abdicando-se de minha presença para meu crescimento profissional: João Paulo.

*Por mais longa que seja a caminhada
o mais importante é dar o primeiro passo.*

Vinícius de Moraes

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Élvio Carlos Moreira, um grande profissional e amigo, por seu exemplo, por todos os ensinamentos, pela acolhida e amparo nas horas mais difíceis.

Aos meus queridos pais Luiz e Vera pelo exemplo de vida, amor, dedicação e pelo incentivo em todos os momentos difíceis.

Ao meu grande amor, João Paulo, pela paciência, compreensão e carinho.

Aos meus irmãos e familiares, pelo apoio de sempre.

Aos Professores José Newton, José Ailton, Rômulo Cerqueira Leite, Francisco Lobato e Ulisses Confalonieri que contribuíram com correções e sugestões valiosas para elaboração deste trabalho.

Ao amigo Antônio Benjamin de Paula, 'Toninho', pela amizade e por compartilhar todos seus valiosos conhecimentos práticos conosco nesta pesquisa.

Ao Professor Marcos Xavier, pela colaboração na análise estatística.

Ao Produtor que disponibilizou seu rebanho para a realização deste estudo.

Aos funcionários da UFMG, assim como aos funcionários da propriedade estudada pelo auxílio durante o trabalho.

Aos alunos da Escola de Veterinária da UFMG que colaboraram com coleta de material para esse estudo.

Às queridas amigas Andreza, Dani, Raquel, Bárbara e Eliane pela amizade e apoio.

À todos os professores que contribuíram para minha formação profissional.

À Universidade Federal de Minas Gerais, pela oportunidade de estudar e crescer profissionalmente e à Universidade Federal de Uberlândia, por minha formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

À todos os demais que direta ou indiretamente participaram desta caminhada.

SUMÁRIO		
	RESUMO	11
	ABSTRACT	11
1	INTRODUÇÃO	12
2	LITERATURA CONSULTADA	13
2.1	Aspectos Epidemiológicos da Leptospirose em Bovinos.....	13
2.2	Isolamento de Leptospiras no Brasil	14
2.3	Isolamento de Leptospiras no Mundo	15
2.4	Biologia Molecular: Identificação e Caracterização de Leptospiras	16
2.5	Controle da Leptospirose em Bovinos	17
2.6	Interferência da Leptospirose nos Índices Reprodutivos	19
3	MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1	Caracterização do local de estudo.....	20
3.2	Caracterização da propriedade e do rebanho.....	20
3.3	Descrição do surto	21
3.4	Coleta de urina	21
3.5	Pesquisa e isolamento de leptospiras.....	21
3.6	Prova Sorológica	21
3.6.1	Antígenos	22
3.6.2	Sorologia	22
3.7	Aplicação das técnicas de biologia molecular	22
3.7.1	Cultivo de Leptospira.....	23
3.7.2	Extração de DNA.....	23
3.7.3	Dosagem de DNA	23
3.7.4	PCR específico rRNA Ribossomal e Sequenciamento.....	23
3.8	Preparação da Vacina.....	24
3.9	Esquema de Vacinação	24
3.10	Monitoramento do Rebanho Pós-vacinação	24
3.11	Avaliação dos Índices Zootécnicos	25
3.12	Base de Dados.....	26
3.13	Análise Estatística	26
3.14	Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	26
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1	Isolamento	26
4.2	Caracterização do Isolado.....	27
4.3	Sorologia e Vacinação	29
4.4	Eficiência Reprodutiva e Produtiva	37
5	CONCLUSÕES	40
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
7	ANEXO.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Frequência de aglutininas anti-Leptospira em 258 soros sanguíneos de bovinos. Fazenda Esperança. Santo Antônio do Monte, MG, 13/09/2007.....	30
Tabela 2	Frequência de aglutininas anti-Leptospira em 236 soros sanguíneos de bovinos. Fazenda Esperança. Santo Antônio do Monte, MG, 25/11/2008. Após cinco meses da vacinação.....	30
Tabela 3	Frequência de aglutininas anti-Leptospira em 176 soros sanguíneos de bovinos. Fazenda Esperança. Santo Antônio do Monte, MG, 16/06/2009. Após seis meses da vacinação.....	31
Tabela 4	Frequência de aglutininas anti-Leptospira em 191 soros sanguíneos de bovinos. Fazenda Esperança, Santo Antônio do Monte-MG, 22/04/2010. Após quatro meses da vacinação.....	31
Tabela 5	Distribuição dos títulos positivos de soro de bovinos avaliados pelo MAT frente à hardjobovis, no período de 13/09/2007 a 16/06/2009. Fazenda Esperança, Santo Antônio do Monte – MG	33
Tabela 6	Distribuição dos títulos positivos de soro de bovinos avaliados pelo MAT frente à hardjo (OMS), no período de 13/09/2007 a 22/04/2010. Fazenda Esperança, Santo Antônio do Monte – MG	33
Tabela 7	Distribuição dos títulos positivos de soro de bovinos avaliados pelo MAT frente à hardjo (Norma), no período de 13/09/2007 a 22/04/2010. Fazenda Esperança, Santo Antônio do Monte – MG	33
Tabela 8 -	Distribuição dos títulos positivos de soro de bovinos avaliados pelo MAT frente à amostra Bolívia, no período de 13/09/2007 a 22/04/2010. Fazenda Esperança, Santo Antônio do Monte – MG	34
Tabela 9 -	Distribuição dos títulos positivos de soro de bovinos avaliados pelo MAT frente à amostra Lagoa, no período de 13/09/2007 a 22/04/2010. Fazenda Esperança, Santo Antônio do Monte – MG	34
Tabela 10 -	Índices zootécnicos do rebanho leiteiro, no período de 2007 a 2009. Fazenda Esperança, Santo Antônio do Monte – MG	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Gel de agarose 1%. Amplificação do fragmento de 1500bp referente à região 16S rRNA ribossomal do gênero leptospira. 1- 1Kb, 2- HB (hardjobovis), 3- Hardjo (OMS), 4- Hardjo (Norma), 5 e 6- Isolado Bolívia, 7- Isolado Lagoa.....	27
Figura 2	Seqüência de DNA do fragmento com 820 bp do isolado de leptospira Bolívia amplificada com os iniciadores 16sF/16sR.....	28

Figura 3	Seqüência de DNA do fragmento com 820 bp do isolado de leptospira amostra Lagoa amplificada com os iniciadores 16sF/16sR.....	28
Figura 4	Seqüência de DNA do fragmento com 820 bp da hardjo (OMS) amplificada com os iniciadores 16sF/16sR.....	29
Figura 5	Seqüência de DNA do fragmento com 820 bp da hardjo (CTG) amplificada com os iniciadores 16sF/16sR.....	29
Figura 6	Evolução cronológica do percentual de bovinos positivos frente às sorovariedades hardjo e amostras Bolívia e Lagoa, no período de 13/09/2007 a 22/04/2010. Fazenda Esperança, Santo Antônio do Monte – MG.....	32
Figura 7	Comparação da reatividade sorológica utilizando o MAT na diluição $\geq 1:100$ em 899 soros de bovinos. Total de 216/899 soros apresentaram reatividade sorológica para pelo menos 1 dos 5 genótipos hardjo testados. Período de 13/05/2007 a 22/04/2010. Fazenda Esperança, Santo Antônio do Monte – MG	35

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Sorovariedades de <i>Leptospira</i> spp. utilizadas no teste de migroaglutinação rápida.....	22
Quadro 2	Sorovariedades de <i>Leptospira</i> spp. utilizadas como amostras na prova de biologia molecular	23
23		
Quadro 3	Primers das regiões 16S rRNA que serão utilizados na PCR	23
Quadro 4	Índices de fertilidade desejados para rebanho leiteiro.....	25

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1	Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	44
---------	---	----

RESUMO

Um surto de leptospirose foi observado em bovinos leiteiros em Santo Antônio do Monte, Minas Gerais. O rebanho apresentava reações positivas anti-*Leptospira hardjo* no teste de microaglutinação (MAT) e havia sido vacinado anteriormente com vacina experimental contendo a sorovariedade hardjo. O MAT revelou 48,06% dos bovinos positivos para sorovariedade hardjo genótipo hardjobovis, 36,82% para sorovariedade hardjo genótipo hardjoprajitno. Os animais apresentavam aborto e mastite com presença de sangue no leite. Foi realizado o isolamento de leptospira a partir da urina de duas vacas com sinais sugestivos da doença. Foi produzida uma bacterina com as duas amostras isoladas. O esquema de vacinação foi constituído de duas doses com intervalo de 45 dias e revacinação semestral. Foram vacinados todos os animais do rebanho com idade superior a quatro meses. A avaliação do progresso da doença após a vacinação foi realizada pelas reações obtidas pelo MAT, pesquisa de leptospira na urina e desempenho reprodutivo e produtivo do rebanho. As amostras isoladas foram identificadas pela sorologia como pertencentes à sorovariedade hardjo e sorogrupo Serjoe. O seqüenciamento da região ribossomal 16s revelou que uma das amostras isoladas pertence à espécie *Leptospira interrogans* genótipo hardjoprajitno e a segunda provavelmente pertença à espécie *L. borgpetersenii* genótipo hardjobovis. O uso da vacina autóctone, aliada ao método de vacinação empregado, foi eficaz no controle da leptospirose no rebanho no período de dois anos. Os resultados da sorologia revelaram ausência de animais positivos na última prova realizada no rebanho. O desempenho reprodutivo e produtivo do rebanho apresentou melhora após a introdução da vacinação, comparado ao ano anterior, quando foi diagnosticada a doença na propriedade.

Palavras-chave: Leptospira, hardjo, bovino, vacina autóctone, isolamento, índices reprodutivos

ABSTRACT

An outbreak of leptospirosis in dairy cattle was observed in Santo Antônio do Monte, Minas Gerais. The herd had positive reactions in anti-*Leptospira hardjo* microagglutination test (MAT) and had been previously vaccinated with an experimental vaccine containing serovar hardjo. The MAT revealed 48.06% of cattle positive for serovar hardjo genotype hardjobovis and 36.82% for serovar hardjo genotype hardjoprajitno. The animals had abortions and mastitis with blood in milk. Was isolated leptospira from the urine of two cows with signs suggestive of the disease. It was produced a bacterin with the two strains. The vaccination schedule consisted of two doses of 45 days and revaccination every six months. The vaccine was administered to all animals in the herd over the age of four months. The assessment of the progress of the disease after vaccination was performed through the reactions obtained by the MAT, leptospira research in the urine and reproductive and productive performance of the herd. Isolates were identified by serology as belonging to serovar hardjo and serogroup Serjoe. Sequencing of ribosomal 16S region revealed that a sample of isolated belong to the species *Leptospira interrogans* genotype hardjoprajitno and the second probably belongs to the species *L. borgpetersenii* hardjobovis genotype. The autochthonous vaccine, combined with the vaccination method used was effective in controlling leptospirosis in cattle in two years. The results showed no positive animals in the last serology in the herd. The reproductive and productive performance of the herd showed improvement after the introduction of vaccination, compared to the previous year, when the disease was diagnosed on the property.

Keywords: Leptospira, hardjo, bovine, autochthonous vaccine, isolation, reproductive rates

1 – INTRODUÇÃO

As leptospiroses são zoonoses cosmopolitas que atingem os animais domésticos, silvestres, sinantrópicos e acidentalmente os seres humanos. São enfermidades bacterianas infecto-contagiosas que afetam a saúde animal e possuem grande importância em saúde pública.

No setor pecuário as leptospiroses são responsáveis por perdas econômicas expressivas. Nos bovinos influenciam negativamente o potencial reprodutivo e produtivo causando aborto, mastite, nascimento de bezerros fracos, levando a queda na produção de leite e carne.

A sorovariedade hardjo é a mais adaptada à espécie bovina. Estudos soro-epidemiológicos realizados no Brasil indicam que essa sorovariedade está amplamente distribuída em praticamente todos Estados do país. Entretanto, o seu isolamento em bovinos leiteiros em Minas Gerais foi descrito apenas por Moreira (1994).

O diagnóstico preciso da infecção por leptospiroses em bovinos depende do isolamento e tipificação da sorovariedade prevalente. No entanto, na maioria dos trabalhos publicados no Brasil, são realizados apenas inquéritos sorológicos que não incluem o isolamento para a identificação do agente, devido à dificuldade na obtenção de resultados conclusivos. O diagnóstico é realizado mediante aplicação da técnica Microaglutinação. Porém este teste apresenta algumas limitações como não permitir a identificação do genótipo específico, além de gerar reações cruzadas entre espécies do gênero leptospira com características antigênicas similares, impossibilitando o diagnóstico preciso referente ao agente infectante.

A dificuldade para identificação da sorovariedade infectante usando técnicas sorológicas e o alto grau de reações cruzadas entre as sorovariedades pode

levar a interpretações equivocadas. Essa dúvida faz com que os laboratórios produzam vacinas polivalentes, com o objetivo de atender uma demanda bem diversificada. Como a resposta imunológica das vacinas anti-leptospira é baixa e específica para cada sorovariedade, o uso dessas bacterinas comerciais acaba se tornando uma medida profilática ineficiente, e aumenta a probabilidade dos animais vacinados se tornarem portadores destes microorganismos (Rodrigues, 2008).

A identificação e caracterização de leptospiroses são fundamentais tanto para a obtenção de um diagnóstico preciso, como para a produção de vacinas mais eficazes. A inclusão, nas vacinas, de sorovariedades que realmente estejam infectando os rebanhos, poderá induzir uma imunidade mais eficiente e duradoura, que refletirão, consequentemente, no controle da doença e melhoramento nos índices reprodutivos e de produtividade animal.

Em uma fazenda leiteira no município de Santo Antônio do Monte, Minas Gerais, foram encontrados animais positivos frente a aglutininas anti-hardjo que já haviam sido imunizados com vacina experimental elaborada com sorovariedade hardjo genótipo hardjoprajitno. Verificou-se nessa propriedade que mesmo após implementação do programa de vacinação os animais apresentavam aumento significativo nos casos de abortos, nascimento de bezerros fracos, mastite com presença de sangue no leite e queda na produção leiteira.

Como a vacina experimental não promoveu o controle da leptospirose nesse rebanho, o presente trabalho investigou esse foco de infecção por leptospira em bovinos leiteiros na Fazenda Esperança, durante o período de 2007 a 2010, e os objetivos específicos foram: 1) isolar e caracterizar as sorovariedades existentes a partir da urina de vacas sorologicamente positivas, 2) elaborar uma vacina experimental com as sorovariedades isoladas no rebanho, 3) avaliar a eficiência do programa de vacinação por meio da sorologia do rebanho

por um período de dois anos, 4) analisar o desempenho reprodutivo e de produtividade do rebanho antes e após a vacinação.

2 – LITERATURA CONSULTADA

As leptospiroses são causadas por bactérias pertencentes ao gênero *Leptospira*, à Ordem *Spirochaetales* e à família *Leptospiraceae*. Dois tipos de classificação de *Leptospira* sp coexistem: uma baseada em características genéticas e a outra baseada em características antigênicas (Levett, 2001).

O gênero *Leptospira* baseado em características antigênicas é dividido em duas espécies: *L. interrogans* que compõe as amostras patogênicas e *L. biflexa* que compõe as amostras saprófitas. As leptospiroses são divididas em sorovariedades com base na reação de soroaglutinação microscópica e reação de absorção cruzada de aglutininas. Sorovariedades de leptospiroses antigenicamente relacionadas são agrupadas em sorogrupos, compondo mais de 200 sorovariedades agrupadas em 23 sorogrupos (Faine et al., 1999).

Métodos moleculares deram nova visão à taxonomia de leptospiroses. Estudos recentes mostraram a presença de heterogeneidade genômica dentro do gênero *Leptospira* e, com isso, foram propostas novas espécies genômicas patogênicas e saprófitas baseadas no grau de homologia do DNA (Yasuda et al., 1987). Segundo características genotípicas existem oito espécies patogênicas: *L. alexanderi*, *L. borgpetersenii*, *L. faine*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. santarosai* e *L. weilii*. As leptospiroses saprófitas ou de vida livre estão englobadas em três espécies: *L. biflexa*, *L. meyeri* e *L. wolbachii*, com raros casos de infecção (Levett, 2001).

Nos bovinos as infecções por leptospiroses frequentemente são subclínicas e associadas a infecções fetais que provocam aborto, parto de natimortos e o nascimento de neonatos fracos com alta taxa de mortalidade (Moreira, 2004). Nos bovinos de leite pode causar agalactia, também

chamada de síndrome da queda de produção do leite que está associada à fase aguda da infecção pela *Leptospira hardjo* (Higgins et al, 1980).

Nessa espécie a transmissão ocorre principalmente pelo contato direto com a urina contaminada e os animais infectados podem eliminar o agente por vários meses mesmo após a sua cura clínica (Faine et al., 1999). A infecção do sistema genital da fêmea e do macho também é forma de manutenção da leptospirose nos rebanhos bovinos (Ellis et al, 1986).

Bovinos são considerados hospedeiros de manutenção da *hardjo*, pois possuem elevada suscetibilidade à infecção, a transmissão é endêmica entre os animais dessa espécie, apresentando a doença na forma crônica, caracterizada por problemas reprodutivos. Essa sorovariedade possui dois genótipos: *hardjobovis* e *hardjoprajitno*. O genótipo *hardjobovis* pertence à espécie *L. borgpetersenii* e o genótipo *hardjoprajitno* à espécie *L. interrogans*. Ambos são importantes causadoras de problemas reprodutivos nos rebanhos bovinos do mundo e possuem diferenças nas suas manifestações clínicas. A infecção causada pela *hardjobovis* é amplamente encontrada em bovinos de diversos países do mundo e é frequentemente caracterizada pela forma subclínica, ocasionando aborto, enquanto que a *hardjoprajitno*, isolada em poucos países, caracteriza-se por ser mais patogênica levando a queda da produção de leite e também problemas reprodutivos (Ellis, 1994).

2.1 - Aspectos Epidemiológicos da Leptospirose em Bovinos

No Brasil, numerosos trabalhos de inquéritos sorológicos têm sido publicados nos últimos anos, e na maioria deles a sorovariedade *hardjo* foi encontrada como a mais frequente, demonstrando a importância dessa sorovariedade como causadora de problemas sanitários em bovinos e sua ampla distribuição espacial no território nacional (Moreira, 2004).

Pellegrin et al. (1999) pesquisaram a prevalência da infecção por leptospira em 756 bovinos provenientes de 28 rebanhos do Pantanal Matogrossense, no período de 1992 a 1996, utilizando o MAT. As sorovariedades mais frequentes foram hardjo-CTG (59,52%) e hardjoprjitno (OMS) (21,28%). Os autores ainda concluíram que este fato estaria confirmando as observações de vários autores que indicam o bovino como reservatório da sorovariedade hardjo e que esta sorovariedade provavelmente seja a mais importante para os bovinos, e a que mais circule nestes rebanhos.

Homem et al. (2000) realizaram o estudo da prevalência da infecção por leptospiros em bovinos do município de Uruará, PA, localizado às margens da rodovia Transamazônica, e encontraram as sorovariedades hardjo e bratislava como as mais frequentes. Em 61,2% dos rebanhos a hardjo estava presente; em 9% deles a bratislava e em 4,5% a shermani.

Langoni et al. (2000) através da pesquisa sorológica em bovinos de regiões de São Paulo, encontraram a sorovariedade hardjo (67,57%) como a mais prevalente nos 2761 soros analisados. Destacaram ainda, que para o controle dessa doença, uma série de medidas profiláticas deveriam ser adotadas, e entre elas incluíam-se vacinação sistemática de todos os animais do plantel, a adoção de medidas higiênico-sanitárias das instalações, a utilização de quarentenário para animais recém-adquiridos antes de sua introdução no rebanho e o tratamento de animais portadores.

Araújo et al. (2005) realizou um estudo sobre a distribuição espaço-temporal de aglutininas anti-*Leptospiras interrogans* em bovinos em Minas Gerais de 1980 a 2002. Encontraram maiores frequências para as sorovariedades hardjo (Norma) (23,7%), hardjo (OMS) (19,7%), hardjo (hardjobovis) (13,8%) respectivamente. Mencionam ainda, a importância do isolamento e tipificação das sorovariedades presentes nos bovinos de Minas Gerais, pois notaram que ocorreram muitas reações cruzadas.

Oliveira e Pires Neto (2004) apresentaram exames sorológicos realizados em 5977 amostras de soros bovinos no Rio Grande do Sul no período de 2000 a 2002. As sorovariedades hardjo (29,71%) e wolffi (13,16%) foram as mais frequentes.

2.2 - Isolamento de Leptospiras no Brasil

No Brasil, foram poucas as sorovariedades isoladas em bovinos: pomona (Freitas et al, 1957), icterohaemorrhagiae (Santa Rosa et al, 1961), goiano e guaicurus (Santa Rosa et al, 1980), hardjo e mini (Moreira, 1994), canicola e copenhageni (Zacarias et al, 2008). As dificuldades em se obter resultados conclusivos com relação ao isolamento em bovinos no país estão associadas à contaminação das culturas, eliminação intermitente do microorganismo na urina e o longo período de obtenção e processamento das amostras.

Freitas et al. (1957) descreveram pela primeira vez a leptospirose como causa de aborto em bovinos no Brasil. Nessa pesquisa foi isolada a sorovariedade pomona de um feto bovino abortado. Foi realizado o isolamento, pela inoculação de material fetal em cobaias e bovinos, coleta de amostra sanguínea após período febril e inoculação em meio de cultura.

Santa Rosa et al. (1961) obtiveram o isolamento da sorovariedade icterohaemorrhagiae a partir de um feto bovino abortado. O feto era proveniente de uma vaca que abortou aproximadamente entre o terceiro e quarto mês, e que após o aborto apresentou icterícia e hemoglobinúria, e morreu quinze dias após o aborto. Para o isolamento foi feito a inoculação de amostra de material fetal por via intraperitoneal em cobaias. Durante o período febril, foram colhidas amostras de sangue, que foram transferidas para meios de cultura e incubados a 28°C. O crescimento foi observado após oito dias.

Santa Rosa et al. (1980) pesquisaram um total de 500 rins de bovinos aparentemente saudáveis de vários Estados do país, e obteve o isolamento de leptospiros a partir de dois rins infectados. Com base no teste

de absorção cruzada de aglutininas foi demonstrado que as cepas pertenciam ao mesmo sorogrupo Hebdomadis, mas eram heterólogas e por isso foram designadas goiano e guaicurus.

Moreira (1994) descreveu um surto em um rebanho de leite com sinais clínicos de abortos, mamites, morte de bezerros com icterícia, repetições de cio, vacas com hematúria e animais com altos títulos de aglutininas anti-*L. hardjo*. Conseguiu o isolamento e tipificação da *L. hardjo* genótipo hardjoprajitno pela primeira vez no Brasil, também foi isolada uma segunda leptospira, tipificada como soroviedade georgia do sorogrupo Mini. Comprovou que em uma mesma propriedade pode existir a infecção por duas ou mais sorovariedades. Realizou também a avaliação de métodos para erradicação de leptospiroses em rebanhos leiteiros e, depois de um período de dois anos, comprovou a efetividade da vacinação na erradicação da doença.

Freitas et al. (2004) empregaram um protocolo diferenciado de cultivo, no qual foi utilizado o meio de cultura Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) modificado acrescido de 5-fluorouracil, cloranfenicol, vancomicina, ácido nalidixico e neomicina. A incubação foi realizada a 28°C por 24 horas, seguida de subcultura em EMJH modificado sem antibiótico e obtiveram o isolamento de leptospiros da urina de três bovinos, 11 cães e dois suínos naturalmente infectados.

Zacarias et al. (2008) coletaram 698 amostras de urina em um frigorífico no Paraná. Encontraram cinco amostras de urina positivas no exame de microscopia em campo escuro. Essas amostras foram semeadas em meio EMJH modificado, sendo possível o crescimento de leptospiros em duas. As estirpes isoladas foram tipificadas, por painel de anticorpos monoclonais, como mais similares ao perfil das amostras de referência dos sorovares canicola (LO-14) e copenhageni (LO-10).

2.3 - Isolamento de Leptospiros no mundo

Myers e Jelambi (1975) além de encontrarem a *hardjo* (45,8%) como a mais frequente entre as sorovariedades testadas em soros de bovinos na Argentina, conseguiram o isolamento em seis dos 161 rins coletados, em dois abatedouros em Buenos Aires. A leptospira isolada foi identificada como a sorovariedade *hardjo*. Relataram a importância epidemiológica dessa leptospira para os bovinos e que os dados presentes na pesquisa demonstram as dificuldades que envolvem o isolamento e a necessidade de metodologias melhores.

Higgins et al. (1980) em uma pesquisa realizada na Inglaterra, no Norte de Yorkshire, encontraram duas propriedades de rebanhos de leite com uma súbita queda de produção de leite e aborto. A partir de amostras de leite de animais com mastite e na urina de vacas infectadas foi possível o isolamento da *Leptospira* sorovariedade *hardjo*. Dois vaqueiros de uma das propriedades se infectaram e apresentaram a doença, desenvolvendo títulos para leptospiros do sorogrupo Hebdomadis.

Ellis et al. (1981) estudaram o papel dos bovinos na manutenção da infecção por *Leptospira interrogans* sorovariedade *hardjo* na Irlanda do Norte. Verificaram que roedores presentes no país não tinham nenhum papel na epidemiologia da infecção pelo sorogrupo Hebdomadis em bovinos. A alta incidência de portadores renais na amostra da população de bovinos indicou que existem sorovariedades pertencentes a esse sorogrupo que são particularmente adaptadas aos bovinos e que esses agem como hospedeiros de manutenção para sorovariedade *hardjo*.

Ribeiro (1988) encontrou a sorovariedade *hardjo* como a mais prevalente em um surto na fazenda da EPAMIG, em Governador Valadares. Demonstrou através dos resultados negativos na sorologia por MAT e isolamento, que os roedores não atuam como fonte de infecção da *hardjo* nos bovinos.

Kingscote (1985) investigou um surto de leptospirose causado por *Leptospira interrogans* sorovariedade hardjo no Sul de Okanagan, Canadá. A sorovariedade hardjo foi isolada de touros e vacas destinadas ao abate, a partir do rim e do líquido cefalorraquidiano. Foi realizado o tratamento em um touro duas vezes em seis meses com diidroestreptomicina na dose 25 mg/kg, no entanto não houve diminuição do título de aglutininas (1:200). Medidas para controlar a leptospirose são sugeridas no estudo.

Prescott et al. (1987) com objetivo de determinar a prevalência da *L. hardjo*, examinaram 117 rins de bovinos abatidos em Ontário. A *L. hardjo* genótipo hardjobovis foi isolada em 11 rins e a sorovariedade kennewicki em um. Todos os isolamentos foram feitos a partir de rins de bovinos de corte confinados. Nenhum isolamento foi obtido de rins de bovinos de corte e de leite criados em sistemas extensivos. Esse achado demonstrou que hardjobovis, a sorovariedade mais encontrada na América do Norte, é bastante comum em bovinos de corte mantidos confinados no sul de Ontário.

Grégoire et al. (1987) realizaram isolamento em 35 dos 122 rins que apresentavam lesões de nefrite intersticial focal em bovinos de corte abatidos em Quebec. Foram identificados 23 como genótipos hardjobovis e seis como a sorovariedade kennewick do sorogrupo pomona. Segundo os autores o fato de que os rins tenham sido processados imediatamente após a coleta foi provavelmente uma das principais razões do sucesso do trabalho. Além disso, afirmaram que a fácil manipulação, e os equipamentos simples necessários para a coleta do material celular fazem possíveis, até em condições desfavoráveis, a realização de estudos similares em outros abatedouros.

2.4 - Biologia Molecular: Identificação e Caracterização de Leptospiras

As espécies *L. interrogans* e *L. borgpetersenii* tem sido extensivamente estudadas com técnicas avançadas de

biologia molecular, pois elas são os agentes causadores da maioria dos casos mundiais de leptospirose tanto em animais de produção como nos seres humanos. Apesar das duas produzirem sintomas clínicos semelhantes, elas são epidemiologicamente muito diferentes. Enquanto a *L. interrogans* sobrevive até 200 dias em água doce e solo úmido em condições ideais, a *L. borgpetersenii* não tolera a privação de nutrientes e é limitado ao ciclo de transmissão hospedeiro-hospedeiro. A pesquisa que levou ao conhecimento desta diferença foi publicada por Bulach et al, (2006), na qual relataram o genoma completo das sequências de duas linhagens de *L. borgpetersenii* sorovariedade hardjo que têm distintos fenótipos e virulência. Analisaram que *L. borgpetersenii* possui um genoma de 700 kb menor que a *L. interrogans*. Foi observado que a perda da função dos genes não foi aleatória, pois afetou a capacidade de sobrevivência do microrganismo no ambiente e o transporte e utilização de metabolitos. Concluíram que a *L. borgpetersenii* está evoluindo em direção a estrita dependência de ciclo de transmissão hospedeiro-hospedeiro.

O seqüenciamento da região ribossomal 16S rRNA tem sido muito utilizado como importante ferramenta para identificação de leptospira em relação a sua espécie (Levett, 2001). Essa região tem sido empregada para estudos filogenéticos, pois é altamente conservada entre as diferentes espécies de bactérias. Além de altamente conservada, os locais de ligação dos primers contém seqüências de regiões variáveis que podem fornecer a identidade de seqüências específicas das espécies, úteis para a identificação bacteriana (Ralph et al., 1993). Como resultado, o seqüenciamento do gene 16S rRNA se tornou freqüente em estudos na área da microbiologia, pois fornece uma resposta rápida e precisa de métodos alternativos para identificação genotípica bacteriana (Clarridge, 2004).

Perolat et al., (1994) examinaram amostras de leptospiras isoladas e classificados no genótipo hardjobovis e hardjoprajitno pela análise região ribossomal 16S e 23S, relataram a presença de inserção na região

23S com tamanho do fragmento de 720 bp em uma amostra do genótipo hardjobovis. Ressaltaram que as técnicas de ribotipagem, arbitrariamente primed-PCR e MRSP (mapped restriction site polymorphisms) permitiram categorizar rapidamente um conjunto significativo de leptospiros isoladas a campo da sorovariedade hardjo ao nível de genoespécies e subespécies. Além disso, baseado na AP-PCR fingerprints foi encontrada heterogeneidade genômica em amostras da espécie hardjobovis. Segundo os autores, a análise dos genes altamente conservados pelas técnicas de ribotipagem e MRSP e de todo genoma pela AP-PCR forneceram resultados consistentes.

Fukunaga et al. (1989) realizaram um estudo que apresentava por objetivo analisar a organização dos genes do RNA ribossomal correspondentes às regiões 16S, 23S e 5S. Concluíram que as leptospiros apresentam uma organização única do seu material genético. A hibridação do genoma demonstrou que houve dois genes 23S rRNA e dois genes 16S rRNA, mas apenas um para o gene 5S rRNA no cromossomo da *L. interrogans*. Os resultados revelaram a importância do fato de que cada gene rRNA está localizado longe um do outro, além disso, existe uma ausência de coesão entre a maioria dos genes ribossomais.

Morey et al. (2006) realizaram um estudo de identificação de leptospiros espécie-específica pela análise de sequenciamento da região gênica 16S rRNA, e comprovaram que o sequenciamento dessa região é potencialmente útil para a identificação de leptospiros. Todas as leptospiros de espécies patogênicas e não patogênicas puderam ser identificadas por sequenciamento dos genes 16S rRNA. O sequenciamento dessa região gênica é um método eficiente para identificação das espécies leptospiros.

2.5 - Controle da Leptospirose em Bovinos

Com relação ao controle da leptospirose no rebanho, em cada um dos componentes da cadeia de transmissão, podem ser aplicadas medidas de controle. Nas fontes de infecção, com a identificação dos animais

positivos; segregação e tratamento dos animais positivos; vigilância epidemiológica dos doadores de sêmen. Nas vias de transmissão, com o saneamento do meio, drenagem, destino adequado de excretas, cadáveres e restos de animais; higiene e desinfecção das instalações e equipamentos zootécnicos; armazenagem adequada de alimentos volumosos e concentrados. Nos susceptíveis com proteção específica pelo emprego de imunógenos preparados com os sorovares de leptospiros presentes na região (Faine et al., 1999).

O tratamento das fontes de infecção tem o objetivo de reduzir o potencial de transmissibilidade. Faz-se uso de antibióticos visando o bloqueio da eliminação de leptospiros através da urina, sêmen e secreção vaginal. Dos distintos produtos ensaiados, a estreptomicina (e seus análogos diidro) aplicada pela via parenteral, usualmente na concentração de 25 mg/kg de peso vivo, têm sido a medicação de escolha (Moreira, 1994), no entanto têm sofrido restrições por causa da presença de resíduos deste antibiótico nos alimentos de origem animal (Ellis, 1994). Além disso, a terapêutica com estreptomicina é dispendiosa para um tratamento em massa, sendo justificado seu uso apenas em animais de reprodução com alto valor zootécnico (Faine et al., 1999).

Bolin et al. (1989) avaliaram a eficácia de uma vacina pentavalente contendo o genótipo hardjopræitno na proteção contra a infecção experimental e os problemas reprodutivos causados pelo genótipo hardjobovis em vacas prenhes. Sete animais foram vacinados uma vez e oito foram vacinados duas vezes com uma vacina pentavalente licenciada pela USDA. Cinco animais foram mantidos como controles não vacinados. Após seis meses da vacinação ou depois das últimas duas vacinações com a vacina pentavalente contendo o genótipo hardjopræitno, as vacas, após serem desafiadas, se tornaram infectadas com a sorovariedade hardjobovis e desenvolveram a infecção renal e fetal. Segundo os autores o regime de vacinação deve ser realizado com uma frequência

maior, deve haver o aumento na concentração de microrganismo nas vacinas pentavalentes ou deve-se fazer o uso de vacinas monovalentes concentradas.

Moreira (1994) avaliou métodos para erradicação de leptospiroses em bovinos leiteiros. Utilizou dois métodos de vacinação com bacterinas produzidas a partir de cepas isoladas na propriedade. O primeiro rebanho recebeu uma dose inicial e revacinações semestrais, e o segundo recebeu duas aplicações iniciais intervaladas de 45 dias, com revacinações semestrais e uma dose de estreptomicina na dose de 25 mg/Kg peso vivo. Em ambos os tratamentos ocorreu um declínio progressivo nos animais reagentes no teste de microaglutinação a partir do 8º mês de implantação da vacinação.

Dhaliwal et al. (1996a) realizaram um estudo sobre o efeito da vacinação contra a *Leptospira interrogans* sorovariedade hardjo na produção de leite e fertilidade do rebanho. Segundo os autores a vacinação não influenciou na melhora da produção de leite, mas melhorou expressivamente a fertilidade do rebanho. A melhora no desempenho reprodutivo nesses animais com alta prevalência da infecção por *Leptospira* indicou que a baixa fertilidade associada à hardjo pode ser controlada através da vacinação.

Costa et al. (1998) avaliaram a imunidade cruzada entre as sorovariedades hardjo e wolffi em quatro grupos de hamsters. A proteção conferida pelas vacinas foi avaliada mediante pesquisa direta de leptospiros (métodos de cultura de macerado de órgãos em meios de Fletcher e EMJH modificado e histopatologia com coloração pela prata) e pesquisa indireta de leptospiros (avaliação de sinais clínicos e estudo histopatológico de fígado, rins e pulmão, pela coloração hematoxilina-eosinados cortes histológicos). O título sorológico dos hamsters foi avaliado pelo teste de microaglutinação rápida em placas. Os resultados revelaram que a vacinação dos hamsters tanto com hardjo quanto como com a wolffi conferiram imunidade ante ao desafio com hardjo.

Bolin e Alt (2001) avaliaram se uma vacina monovalente produzida com a *Leptospira borgpetersenii* sorovariedade hardjo (tipo hardjobovis), vendida comercialmente na Austrália, Nova Zelândia, Irlanda e no Reino Unido, iria proteger os bovinos da colonização renal e urinária quando esses fossem expostos a uma estirpe americana de *L. borgpetersenii* sorovariedade hardjo. Os resultados indicaram que os bovinos que receberam duas doses da vacina comercial hardjo foram protegidos contra a colonização renal e urinário quando desafiados com *L. borgpetersenii* sorovariedade hardjo até quatro meses após a vacinação.

Rodrigues (2008) avaliou os níveis de anticorpos de dez vacinas anti-leptospira: nove comerciais polivalentes e uma experimental monovalente, produzida com a sorovariedade hardjoprajiitino amostra Norma. Foi empregado o MAT e ELISA indireto para dosagem de anticorpos. Os resultados mostraram que todas as bacterinas produziram algum tipo de resposta, mas somente nos dias 60 e 270 obtiveram níveis de anticorpos protetores não atingindo a totalidade dos animais utilizados. Os grupos vacinados não apresentaram mesma homogeneidade de resposta de anticorpos sugerindo a necessidade de aumentar a concentração da sorovariedade hardjo para melhorar a resposta imunológica. Segundo o autor os protocolos para vacinas polivalentes devem ser revisados para que a hardjo apresente resposta sorológica adequada para revacinações semestrais.

Arduino et al. (2009) avaliaram títulos de anticorpos aglutinantes induzidos por vacinas comerciais em bovinos. Utilizaram 100 animais divididos em cinco grupos que receberam quatro vacinas comerciais e um grupo controle. Os animais foram investigados dos dias 0 ao 180 pós-vacinação frente a todas as sorovariedades utilizadas nas vacinas e relataram não haver homogeneidade nos títulos para cada sorovariedade, sendo as sorovariedades hardjo e wolffi que produziram maior média de títulos médios durante o experimento. Uma das vacinas apesar de não possuir a wolffi em sua composição foi capaz de

induzir anticorpos aglutinantes contra esta sorovariedade, essa vacina foi a que induziu os maiores títulos médios de anticorpos.

2.6 - Interferência da Leptospirose nos Índices Reprodutivos

A eficiência reprodutiva é um dos principais fatores que influenciam a produtividade do rebanho leiteiro. O desempenho reprodutivo pode ser afetado por diversos fatores como deficiências nutricionais, problemas sanitários e falhas na identificação de cio (Radostits e Blood, 1986). Todos esses fatores contribuem para o atraso no retorno à atividade ovariana pós-parto, aumenta o período de serviço e o intervalo entre parto, reduz o período de lactação e diminui a produção de bezerros por ano e durante sua vida útil. Conseqüentemente, os custos de produção são elevados pela manutenção de animais com baixa produção no rebanho (Azêvedo et al, 2001).

A leptospirose está entre as principais enfermidades causadoras de problemas reprodutivos em bovinos no mundo. Um dos aspectos mais importantes dos efeitos da leptospirose nas criações de animais de produção são os prejuízos econômicos que essa doença ocasiona por influenciar o potencial reprodutivo do rebanho. As perdas econômicas são ocasionadas por problemas na esfera reprodutiva e produtiva, pois quando a doença se instala num rebanho ela causa infertilidade, aborto, nascimento de crias fracas, repetição de cio, retenção de placenta, queda na produção de leite e carne, assim como aumentos nos custos de produção devido a despesas com assistência veterinária, exames laboratoriais, vacinas e medicamentos (Ellis, 1994).

Os padrões desejáveis de eficiência reprodutiva, isto é, a produção de uma cria por ano, com intervalo de parto de 12 meses e período de lactação de 10 meses, podem ser obtidos, no entanto é preciso que ocorra uma adequada interação dos parâmetros genéticos, reprodutivos, sanitários e nutricionais. Para tanto, torna-se necessário a análise do desempenho reprodutivo animal, estabelecendo e avaliando

parâmetros e índices reprodutivos, para que se possa identificar, definir metas, monitorar e solucionar os fatores que estão comprometendo a eficiência reprodutiva e produtiva do rebanho (Azêvedo et al. 2001).

Bennett (1993) realizou um estudo sobre a leptospirose, e as estratégias para seu controle e os custos e benefícios envolvidos. Descreveu os resultados de modelos matemáticos da doença que foram realizados para ajudar a explorar os riscos e as implicações financeiras da infecção por *Leptospira interrogans* sorovariedade hardjo para os produtores de leite.

Quinlan e McNicholl (1993) relataram infecção por *Leptospira interrogans* sorovariedade hardjo em fazenda leiteira na Irlanda. Os animais da fazenda haviam sido previamente vacinados à cinco meses, e apresentaram sinais clínicos de agalactia e infertilidade, seguida de uma queda na produção de leite. O rebanho apresentou baixa fertilidade indicada pela taxa de concepção ao primeiro serviço que foi de 49%.

Dhaliwal et al. (1996b) avaliaram o impacto da infecção por *Leptospira interrogans* sorovariedade hardjo sobre o desempenho reprodutivo de nove rebanhos leiteiros com evidência da infecção. Foram analisados os dados relativos ao primeiro ano do diagnóstico, 50% das variáveis de fertilidade tiveram seus valores mais baixos só no ano de diagnóstico. Uma avaliação do estado de fertilidade do rebanho por meio da taxa de concepção ao primeiro serviço, o número de serviços por concepção, intervalo entre partos e taxa de abate, revelou baixo desempenho reprodutivo durante o ano de diagnóstico em seis dos nove rebanhos. Taxas de aborto foram maiores em quatro rebanhos durante o ano de diagnóstico, incluindo os rebanhos que não apresentavam baixa taxa de fertilidade. Concluíram que a *L. interrogans* sorovariedade hardjo afetam negativamente a reprodução por causar tantos abortos e baixa fertilidade, mas que o efeito é temporário.

Mineiro et al. (2007) realizaram uma pesquisa de aglutininas anti-leptospiras pela

técnica de microagutinação em bovinos de leite na Microrregião de Parnaíba-PI. Das 1975 amostras analisadas, 1044 (52,9%) mostraram-se positivas a pelo menos uma sorovariedade e todos os rebanhos apresentaram animais reagentes. As sorovariedades mais frequentes foram hardjo e wolffi presentes em 100% dos rebanhos. Foi constatada associação entre infecção e ocorrência de transtornos reprodutivos, e a sorovariedade que apresentou maior associação foi hardjo.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Caracterização do local de estudo

O experimento foi realizado na Fazenda Esperança, localizada no município de Santo Antônio do Monte, situado na região Oeste de Minas Gerais. O município localiza-se a 194 km de Belo Horizonte, encontra-se a uma altitude de 1.052 m acima do nível do mar, e coordenadas de 20° 05' 13" latitude sul e 45° 17' 38" longitude oeste. O clima da região é o subtropical de altitude, tem predominância de ventos NE (Nordeste) e a temperatura média anual oscila em torno de 23° C, variando entre 10°C a 35°C. Com relação às chuvas, a precipitação anual varia de 1.800 a 2.000 mm, e o período mais chuvoso ocorre entre os meses de outubro a abril. Localiza-se na bacia hidrográfica do Rio São Francisco e do Rio Pará. Possui vegetação de cerrado, constituída por árvores de pequeno porte (<http://www.samonte.mg.gov.br>).

Em relação à pecuária, o município possui uma população bovina de 69.703 cabeças segundo a pesquisa pecuária municipal publicada no censo agropecuário do IBGE (2006). A agropecuária no município é caracterizada pela atividade familiar e empresarial. Desenvolve-se em estabelecimentos rurais nos quais cerca de 80% destas propriedades não ultrapassam 50 ha.

3.2 - Caracterização da propriedade e do rebanho

A seleção da fazenda foi realizada por acompanhamento da rotina de exames

executados no Laboratório de Zoonoses do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP) da UFMG pelo teste de microaglutinação (MAT). Os resultados com altos títulos aglutinantes frente às sorovariedades hardjo (genótipo hardjoprajitno - amostras Norma e OMS e genótipo hardjobovis) detectados em associação ao histórico de animais com problemas de abortos, natimortos, nascimentos de crias fracas, infertilidade, repetições de cio e mamites foram determinantes para a escolha da propriedade.

A Fazenda Esperança possui uma área total de 150 hectares, com 75 hectares de área de pastagem. As finalidades de produção pecuária são cria e recria e o sistema de produção de leite é semi-intensivo. O processo de retirada do leite é realizado por ordenha mecânica.

No início da pesquisa, o rebanho era constituído por 263 bovinos de aptidão leiteira, da raça Holandesa e animais mestiços (Holândes x Zebu), compondo 61 bezerras, 70 novilhas, 130 vacas e dois touros. O método reprodutivo utilizado é inseminação artificial com repasse de touros.

3.3 - Descrição do surto

No início de 2005 foi constatada a ocorrência de problemas reprodutivos caracterizados por abortamentos, natimortalidade, nascimento de animais com peso corporal abaixo da média da raça, além de mastite e baixa produtividade leiteira. O veterinário da propriedade suspeitou que se tratasse de uma doença da reprodução e enviou amostras de soros dos animais com suspeita clínica para a Escola de Veterinária da UFMG, para que fossem submetidos a exames de diarreia bovina a vírus, rinotraqueíte infecciosa dos bovinos e leptospirose. Os resultados confirmaram que o rebanho estava positivo para leptospirose, e estava negativo para as outras enfermidades pesquisadas. Além disso, o rebanho possuía resultados negativos em testes recentes para brucelose e tuberculose.

O primeiro envio de soro de bovinos da Fazenda Esperança ao Laboratório de Zoonose da EV da UFMG foi realizado em 17/02/2005. Das oito amostras de soro enviadas, três (37,5%) estavam positivas para hardjobovis e hardjo (OMS), uma (12,5%) estava positiva para hardjo (Norma) e uma (12,5%) para pomona. Em uma nova sorologia realizada em 13/06/2005 dos seis soros enviados, quatro (66,67%) estavam positivos para as três amostras de hardjo testadas (hardjo amostra Norma, OMS e hardjobovis). Em 03/09/2005 foi realizada outra sorologia em seis soros, desses cinco (83,33%) amostras estavam positivas para hardjobovis e quatro (66,67%) estavam positivos para hardjo (Norma) e hardjo (OMS). Nas três remessas foram encontradas altas porcentagens de reações positivas de aglutininas anti-hardjo.

Em julho de 2005, o rebanho foi vacinado com uma bacterina experimental contendo a sorovariedade hardjoprajitno. O esquema de vacinação foi de duas doses com intervalo de 45 dias e revacinação semestral. Foram vacinados todos os animais acima de quatro meses. Após dois anos de vacinação, os resultados no teste de Microaglutinação frente às sorovariedades hardjo continuaram positivos e o rebanho persistia com sinais sugestivos de leptospirose. Houve a suspeita de que a sorovariedade hardjo genótipo hardjobovis poderia ser o agente etiológico envolvido na doença da propriedade.

3.4 - Coleta de urina

Foram coletadas 20 amostras de urina de fêmeas sorologicamente positivas pelo Teste de Microaglutinação (MAT) frente à sorovariedade hardjo e com histórico de problemas reprodutivos. Inicialmente, a região do períneo foi limpa e as amostras de urina foram obtidas após massagem desprezando-se o jato inicial. A coleta foi realizada com frasco esterilizado de 50 ml.

3.5 - Pesquisa e isolamento de leptospiros

A pesquisa de leptospira foi realizada por meio de microscopia direta com microscópio (Carl Zeiss¹) em objetiva 40x, ocular 10x e condensador de campo escuro e seco.

Para o isolamento de leptospiros, foi estruturado um pequeno laboratório na propriedade para processamento das amostras de urina. O material utilizado para o isolamento foi previamente esterilizado e o local de trabalho foi limpo e higienizado. A urina foi imediatamente diluída a 1:10 em solução salina estéril, pH 7,2. Posteriormente, inoculou-se 0,5 ml desta diluição em duas séries de cinco tubos cada, contendo meios de Fletcher e meio EMJH (Ellinghausen e McCulloug, 1965) modificado com fração "V" de albumina bovina. Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica em aerobiose a 28°C e observou-se semanalmente, em microscópio de campo escuro, se houve crescimento de leptospiros. Foi considerado positivo aquele que apresentasse células com morfologia e movimentação compatíveis com *Leptospira* spp. Os tubos nos quais foi observado crescimento de leptospiros foram submetidos à descontaminação por meio de técnicas de diluição e filtração (Faine et al., 1999).

3.6 - Prova Sorológica:

3.6.1 – Antígenos

As culturas foram mantidas em meio EMJH (Ellinghausen e McCulloug, 1965) modificado com fração "V" de albumina bovina e utilizadas após sete dias de crescimento.

A relação das amostras de *Leptospira* sp que foram utilizadas como antígenos estão registradas no quadro I. Também foram incluídas as sorovariedades isoladas na propriedade.

¹ Carl Zeiss, Inc. Germany

Quadro 1 - Sorovariedades de *Leptospira* spp. utilizadas no Teste de Microaglutinação:

Espécie Genômica	Sorogrupo	Sorovariedade	Amostra de Referência
<i>L. interrogans</i>	ICTEROHAEMORRHAGIAE	icterohaemorrhagiae	RGA ¹
<i>L. interrogans</i>	POMONA	pomona	Pomona ¹
<i>L. interrogans</i>	SEJROE	hardjo	Hardjoprajitno (OMS) ¹
<i>L. interrogans</i>	SEJROE	hardjo	Hardjoprajitno (Norma) ²
<i>L. borgpetersenii</i>	SEJROE	hardjobovis	Sponselee ¹
<i>L. borgpetersenii</i>	MINI	mini	Cantagalo (CTG) ²
<i>L. kirshneri</i>	GRYPPOTHYPHOSA	gryppothyphosa	Moskva V ¹

1 - Amostras de *Leptospira* spp. obtidas do antigo Centro Centro Panamericano de Zoonoses da Organização Panamericana da Saúde

2 - Amostras isoladas de bovinos em Minas Gerais, Brasil por Moreira (1994), tipificadas no Royal Tropical Institute em Amsterdã, Holanda.

3.6.2 – Sorologia

A pesquisa de aglutininas anti-leptospiras foi realizada utilizando-se o Teste de Microaglutinação (MAT), descrito por Galton (1965).

As leituras foram realizadas com microscópio de campo escuro em objetiva de 10x. O critério utilizado para a leitura do grau de aglutinação foi dado em cruzeiros:

- a reação quatro cruzeiros (4+) ocorre quando cerca de 100% das leptospiras no campo estão aglutinadas;
- três cruzeiros (3+) quando aproximadamente 75% das leptospiras no campo estão aglutinadas;
- duas cruzeiros (2+) quando aproximadamente 50% estão aglutinadas;
- uma cruz (1+) quando aproximadamente 25% de aglutinação das leptospiras no campo.

Foram considerados positivos os soros diluídos a partir de 1:100 quando no campo

microscópico apresentaram no mínimo 50% ou mais de leptospiras aglutinadas.

3.7 – Aplicação de técnica de biologia molecular

A técnica de biologia molecular foi desenvolvida no Laboratório de Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais com a colaboração da aluna Maria Raquel Venturim Cosate, doutoranda do Curso de Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

3.7.1 - Cultivo de leptospira

As amostras de referência utilizadas foram cultivadas em meio líquido EMJH (Ellinghausen e McCullough, 1965) modificado com fração “V” de albumina bovina. As leptospiras foram repicadas semanalmente e incubadas a 28°C por um período de 7-10 dias.

A relação das amostras de *Leptospira* sp estão registradas no quadro 2.

Quadro 2 - Sorovariedades de *Leptospira* sp utilizadas como amostras de referência:

Espécie Genômica	Sorogrupo	Sorovariedade	Amostra de Referência
<i>L. interrogans</i>	SEJROE	hardjo	Hardjoprajitno (OMS) ¹
<i>L. interrogans</i>	SEJROE	hardjo	Hardjoprajitno (Norma) ²
<i>L. borgpetersenii</i>	SEJROE	hardjobovis	Sponselee ¹

1 - Amostras de *Leptospira* spp obtidas do antigo Centro Centro Panamericano de Zoonoses da Organização Panamericana da Saúde

2 - Amostras isoladas de bovinos em Minas Gerais, Brasil por Moreira (1994), tipificadas no Royal Tropical Institute em Amsterdã, Holanda.

3.7.2 - Extração de DNA

A extração do DNA das leptospiiras foi realizada através do método convencional fenol-clorofórmio descrito por Sambrook et al. (1989).

3.7.3 - Dosagem de DNA

As concentrações de DNA obtidas a partir dos cultivos de leptospiiras foram determinadas pela eletroforese em gel de agarose 1%, comparado com o padrão de

peso molecular DNA/ Hind III. A dosagem de DNA foi realizada de acordo com método descrito por Sambrook et al. (1989).

3.7.4 - PCR – específico - rRNA Ribossomal e Sequenciamento

A escolha dos iniciadores foi realizada a partir das duas seqüências relatadas por Fukunaga et al. (1989), que corresponde a uma amostra classificada na espécie *Leptospira interrogans* sorovariedade canicola amostra Moulton.

Quadro 3 – Primers das regiões 16S rRNA de *Leptospira* sp que foram utilizados na PCR:

Primers	Sequencias	Amplicon
16S rRNAF 16S rRNAR	5'-GTAAAGATTTATTGCTCGGAG-3' 5'- TGTGGCCGAACACCCTCTCAGGC-3'	1600 bp

Foi realizada a amplificação específica das regiões 16S rRNA ribossomal com as amostras de referência descritas no quadro 2. A sua escolha foi devido ao alto grau de conservação apresentado por esta região, possibilitando a caracterização dos isolados ao nível de espécie. A PCR foi realizada de acordo com as descrições feitas por Ralph et al, (1993).

Os amplicons obtidos foram purificados em Sephacryl S-200 (GE Healthcare) e analisados em gel de agarose 1%, corados com brometo de etídio 0,5 µg/ml sob agitação suave durante aproximadamente 10 minutos. Após esta etapa o gel foi examinado sob luz ultravioleta e as concentrações dos DNA foram determinadas comparativamente com o padrão de peso molecular DNA/HindIII (Invitrogen).

A purificação dos amplicons foi realizada com o objetivo de utilizar as amostras para a técnica de sequenciamento. O sequenciamento foi realizado no aparelho MegaBace (GE Healthcare). As reações de sequenciamento foram realizadas de acordo com o protocolo para o MegaBACE 1000, utilizando o DYEnamic ET Dye Terminator Kit (com Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase). As sequências foram analisadas pelo software Sequence Analyser utilizando o Base Caller Cimarron 3.12. Os resultados foram comparados no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) usando Blast® (Basic Local Alignment Search Tool) para a identificação do grau de identidade das sequências.

3.8 - Preparação da Vacina

Foi produzida uma bactéria com as amostras isoladas na propriedade. As amostras isoladas foram cultivadas em meio EMJH (Ellinghausen e McCullough, 1965) modificado com fração "V" de albumina bovina por um período de 14 dias a 28°C. O crescimento foi monitorado semanalmente. Foi considerada positiva a cultura que apresentasse células com morfologia e movimentação compatíveis com *Leptospira* spp. (Faine et al., 1999). A contagem de

células foi realizada de acordo com descrito por Rodrigues (2008) em câmara de Petroff-Hausser. Ao final da segunda semana a cultura apresentou uma densidade 1×10^9 células/ml e posteriormente foi inativada com formaldeído na concentração final 0,3% (V/V), dividida em três alíquotas de 1000 ml. Cada alíquota foi emulsionada em adjuvante de emulsão óleo em água (Emulsigen®) na concentração de 20% e acrescentado vermelho fenol 0,01% como indicador de pH (7,2).

A bactéria foi homogeneizada em homogeneizador circular² durante 24 horas com 96 rotações por minuto. A vacina foi avaliada previamente com relação à pureza e inocuidade, conforme normas preconizadas pela OIE (2010).

3.9 - Esquema de Vacinação

Foram vacinados todos os animais que possuíam idade superior a quatro meses. A dose utilizada em cada bovino foi de 5,0 ml, inoculada por via subcutânea na região do terço proximal do pescoço. Os animais receberam duas doses com intervalo de 45 dias e revacinação semestralmente.

3.10 – Monitoramento do Rebanho Pós-vacinação

Foi realizado o acompanhamento semestral do rebanho vacinado por dois anos. Coletou-se sangue para realização da sorologia e urina para a pesquisa de leptospiros por meio de microscopia de campo escuro e isolamento através da cultura.

Após a implementação do programa de controle com vacina autóctone, foram examinadas 60 amostras de urina. As coletas foram realizadas em 29/03/2008, 25/11/2008, 16/06/2009 e 22/04/2010, em cada uma foram coletadas 15 amostras de urina de animais com problemas reprodutivos. Foi realizada a limpeza da

² Jankle & Kinkel Ika Werk Stalfeni Breisgaw TYP – T45

região do períneo e as amostras de urina foram obtidas após massagem desprezando-se o jato inicial. A coleta foi realizada com frasco esterilizado de 50 ml.

O sangue foi colhido da veia caudal externa em tubos Vacutainer® de 10 mL, e foram armazenados em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável. As amostras de sangue total foram submetidas à centrifugação a 3.000 rpm por 5 min, e retirado o sobrenadante (soro), identificadas e congeladas a -20°C até o momento da utilização. Foi coletado sangue de todas as novilhas, vacas e touros do rebanho. A variação do tamanho da amostra em cada coleta de sangue ocorreu devido à venda de animais do rebanho.

3.11 - Avaliação dos Índices Zootécnicos

Foram analisados os índices zootécnicos do rebanho antes e depois da vacinação. Essa análise foi realizada com o objetivo de avaliar se houve mudança do desempenho reprodutivo do rebanho depois da vacinação, visto que as leptospiroses são doenças que causam problemas na esfera reprodutiva. Os dados foram colhidos por meio de entrevista com o proprietário, vaqueiro, assim como pela análise das anotações zootécnicas da propriedade.

Os índices avaliados foram: intervalo entre partos (IP), período de serviço (PS), período de lactação (PL), taxa de aborto, taxa de concepção ao primeiro serviço, e produção de leite dia (Azêvedo et al, 2001).

O intervalo entre partos (IP) foi calculado com a seguinte fórmula:

$$P1 = A1 \times 365 + M1 \times 30 + D1$$

$$P2 = A2 \times 365 + M2 \times 30 + D2$$

$$IP = P2 - P1$$

A1 = Ano do parto 1

A2 = Ano do parto 2

M1 = Mês do parto 1

M2 = Mês do parto 2

D1 = Dia do parto 1

D2 = Dia do parto 2

IP = Intervalo entre partos

Os índices reprodutivos calculados serão comparados aos índices de fertilidade desejáveis para rebanho leiteiro descritos no quadro 4.

Quadro 4 - Índices de fertilidade desejados para rebanho leiteiro:

Parâmetro	Índices Desejáveis
Intervalo de Partos (meses)	12
Período de Serviço (dias)	85
Período de Lactação (meses)	10
Serviços por Concepção	<1,5
Idade Média ao 1º Parto (meses)	24
Taxa de concepção ao 1º serviço (%)	70
Taxa de Aborto (% de vacas prenhes que abortam por ano)	< 5

Adaptado de Radostits e Blood (1986).

3.12 - Base de Dados

A organização da base de dados e a construção de tabelas e figuras foram realizadas em planilhas eletrônicas do programa Microsoft Excel versão 2007.

3.13 - Análise Estatística

As diferenças observadas nos índices foram testadas pelo teste Qui-quadrado, T student e Kruskal-Wallis conforme descrito por Sampaio (1998), fixando-se o nível de significância em $p < 0,05$.

3.14 - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

Essa pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) na UFMG e foi aprovada em reunião em 10/09/2008 com número de protocolo 163/08 (Anexo 1).

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Isolamento

Na primeira coleta de urina em animais com sinais clínicos e subclínicos de leptospirose realizada em 13/05/2009, 20 amostras foram submetidas ao exame direto por microscopia de campo escuro. Não foi observado resultado positivo ao exame direto. As amostras foram inoculadas em meio EMJH modificado. Na quarta semana foi observado crescimento bacteriano em duas amostras de urina. As leptospiros isoladas passaram a fazer parte da bateria de antígenos utilizada nos testes sorológicos com a finalidade de se obter uma identificação preliminar do sorogrupo envolvido. As amostras foram identificadas com o nome de Lagoa e Bolívia, que eram os nomes das fêmeas nas quais essas amostras foram isoladas.

A inoculação imediata das amostras de urina em meio EMJH realizada em laboratório estruturado na fazenda possivelmente foi fator decisivo para o isolamento bem sucedido ocorrido nesta

pesquisa. Fatos que estão de acordo com os relatos de Grégoire et al., (1987); Higgins et al. (1980) e Freitas et al. (2004).

O crescimento rápido de leptospiros após quatro semanas de incubação indicou que o meio EMJH enriquecido com albumina bovina utilizado nesta pesquisa foi eficiente para o crescimento das amostras de leptospiros isoladas. Fato semelhante foi observado nos estudos de Kingscote (1985), Moreira (1994) e Higgins et al. (1980), os quais também utilizaram esse meio. Em contrapartida nos estudos realizados por Freitas et al. (2004) e Zacarias et al. (2008), os cultivos de leptospiros em meio EMJH modificado decresceram em concentração celular e motilidade, sendo necessário o cultivo em meio Tween 80/40/LH.

Após a implementação do programa de controle com vacina autóctone, foram examinadas 60 amostras de urina. Não foram observadas amostras de urina positivas ao exame direto por microscopia de campo escuro. Não houve crescimento em cultura nas 60 amostras de urina inoculadas em meio EMJH modificado.

As dificuldades com relação ao isolamento de leptospiros, devido a fatores como interferência do meio de cultura utilizado e a contaminação das culturas por microorganismos, foram citadas por inúmeros autores (Myers e Jelambi, 1975; Higgins et al., 1980; Prescott et al., 1987; Freitas et al., 2004). Na presente pesquisa obteve-se o isolamento em apenas duas amostras de urina, e após a vacinação não foi possível o isolamento em nenhuma amostra de urina. Fato semelhante também ocorreu na pesquisa de Bolin et al. (1989), na qual não conseguiram isolar leptospiros da urina e dos rins de vacas vacinadas. Segundo os autores a razão para essa dificuldade está relacionada com a presença de anticorpos IgG na urina dos animais vacinados, que interferem no crescimento da hardjo *in vitro*.

A vacinação não impede a leptospiúria nos animais infectados, mas pode reduzir o

número de animais que se tornaram excretadores e diminuir a duração da leptospiúria nos animais que já estão infectados (Quinlan e McNicholl, 1993).

Outro fator que pode ter dificultado o isolamento após a vacinação é que a excreção de leptospiros pela urina é intermitente, algumas vezes esporádica e muito variável entre os animais, sobretudo em espécies que são hospedeiras de manutenção de determinadas sorovariedades (Faine et al., 1999).

No Brasil, existem poucas pesquisas relacionadas ao isolamento de leptospiros em bovinos infectados naturalmente. As sorovariedades isoladas em bovinos no país se restringem à pomona, icterohaemorrhagie, guaicurus e goiano, hardjo e mini, canicola e copenhageni (Freitas et al, 1957; Santa Rosa et al., 1961; Santa Rosa et al.; 1980; Moreira, 1994; Zacarias et al., 2008). Provavelmente as dificuldades associadas ao isolamento e

identificação de isolados de leptospira são fatores decisivos para o pequeno número de pesquisas publicadas com relação a esse tema no Brasil. Além disso, essas dificuldades apontam também para necessidade de aprimoramento científico para o encontro de técnicas mais precisas e rápidas.

O isolamento e identificação permitem o diagnóstico definitivo da infecção levando ao conhecimento daquelas sorovariedades que realmente estão presentes em determinada região, contribuindo, dessa forma, para elaboração de medidas de prevenção e controle da doença.

4.2 - Caracterização do Isolado

Foi realizada a amplificação específica das regiões 16S rRNA ribossomal das cepas de *Leptospira* spp. O produto do PCR encontrado foi de 1500 bp para as seis amostras analisadas na figura 1.

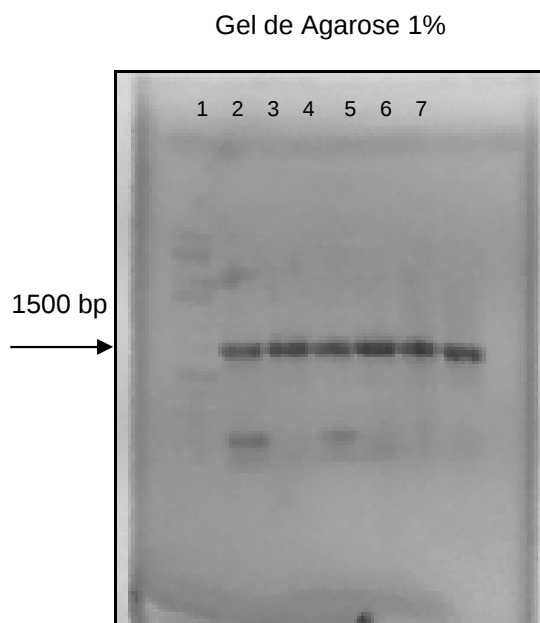


Figura 1 – Gel de agarose 1%. Amplificação do fragmento de 1600bp referente à região 16S rRNA ribossomal do gênero leptospira. 1- 1Kb, 2- HB (hardjobovis), 3- Hardjo (OMS), 4- Hardjo (Norma), 5 e 6- Isolado Bolívia, 7- Isolado Lagoa.

Após a amplificação dos fragmentos foi realizado sequenciamento parcial das amostras isoladas Lagoa e Bolívia e as duas amostras classificadas no genótipo hardjoprajitno amostras Norma (CTG) e OMS, como demonstrado nas figuras 2 a 5. As seqüências foram analisadas no programa Blast®, no qual foram determinadas as homologias com as seqüências existentes no banco de dados. Foi observado que a amostra Lagoa apresentou homologia de 95% com a espécie *L. borgpetersenii* genótipo

hardjobovis e a espécie *L. interrogans* genótipo hardjoprajitno, enquanto que a amostra Bolívia apresentou 98% de homologia com a espécie *L. interrogans* e nenhuma homologia com a espécie *L. borgpetersenii* genótipo harjdobovis. As amostras de referência classificadas no genótipo hardjoprajitno, Norma (CTG) e OMS, também foram analisadas no Blast® e como já era esperado apresentaram homologia de respectivamente 93% e 96% com a espécie *L. interrogans*.

CTACGCTGGCGGCGCGTCTTAACATCAGTCAAGCGGAGTAGCAATACTCAGCGGCGAACGGGTGAGTAAC
ACGTGGGTAATCTTCTCTGAGTCTGGGATAACTTTCCGAAAGGGAAGCTAATACTGGATGGTCCCGAGA
GATCAAAGATTTTTCTGGGTAAAGATTTATTGCTCGGAGATGAGCCCGCTCCGATTAGCTAGTTGGTGAG
GTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCGGTAGCCGGCTGAGAGGGTGTTCGGCCACAATGGAAGTGAAGACA
CGGTCCATACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTTAAGAATCTTGCTCAATGGGGGGAACCCTGAAGCAGCGACG
CCGCGTGAACGATGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGTTCAGTAAGCAGGGAAAAATAAGCAGCAATGTGATG
ATGGTACCTGCCTAAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTATGGTGCAAGCGTTG
TTCGGAATCATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGACATGTAAGTCAGGTGTGAAAAGTGCAGGCTCAAC
TCGCAGCCTGCACCTGAAACTATGTGTCTGGAGTTTGGGAGAGGCAAGTGGAATTCCAGGTGTAGCGGTG
AAATGCGTAGATATCTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTTGCTGGCCTAAAAGTACGCTGAAGCA
CGAAGCGTGGGTAGTGAACGGGATTAATACCCCGGTAATCCACCCCTAACGTTGTCTACCAGTTGTTGG
GGGTTTTAACCTCAGTAACGACCTACGGATAAGTAAACCCCTGGGGACT

Figura 2 - Seqüência de DNA do fragmento com 820 bp do isolado de leptospira Bolívia amplificada com os iniciadores 16sF/16sR.

CGAGTTTCACCTTAGTAGTCTGCTTCCTTGCGGTTGGCAAAGACCACTTCGGGTGCTCCCCACTCAGGTG
GGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGTCCGGGAACGTATTCACCGCGCATGCTGATCCGCGATTACTAGACG
ATTCCGACTTCATGGATCGAGTTGCAGACTCCAATCCGAAGTGGGACCGGATTTTTGAGATTACTCCCC
TCGCGAGTTGCTACCCCTTTGTACCGGCCATTGATCACGTGTGTTGCCCTAGACATAAAGGCCATGAGATT
TGACTCATCCCCGCCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCATTCTTACAGTGCCCAACTGAATGATGGCAACT
AAGTGAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACTCTCACGACAGGCTGACGACAACCATGCAG
CACCTGTGAAGCGGCCCGAAGGCTCATGTATCTCTACTGATTCCACTCCATGTCAAGCCTAGGTGAGGTT
TTTCGCGTATCATCAAATTAACACATGTCCACCGCTTGTCGGGACCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTC
ACTCTTGCGAGCATAGTCCCCAGGCGGTCTACTTAATCCGTTAGGTTCTTACTGAGTTAAAACCCCCACA
ACTGGGTAGAAACGTTAGGGGTGGATTACCGGGGTATCTAATCCCGTTCACTACCCACGCTTTTCGTGCC
TCACCGTCAGTTTTAGCCACAAGTCGCCTTCCCACTGGGGTTCCCAAAATCTACGCATTACCGCTACC
TGGAATTCCCTTGCTCTCCCAACTCCAAAAATTCAGGAGCTGGATTGAC

Figura 3 - Seqüência de DNA do fragmento com 820 bp do isolado de leptospira amostra Lagoa amplificada com os iniciadores 16sF/16sR.

CGAACTACGCTGGCGGCGCGTCTTACATCAAGTCAAGCGGAGTAGAATACTCAGCGGCGAACGGGTGAGT
AACACGTGGGTAATCTTCTCTGAGTCTGGGATAACTTTCCGAAAGGGAAGCTAATACTGGATGGTCCCC
AGAGATCAAAGATTTTTTCGGGTAAAGATTTATTGCTCGGAGATGAGCCCGCGTCCGATTAGCTAGTTGGT
GAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTTCGGCCACAATGGAAGTGAAG
ACACGGTCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTTAAGAATCTTGCTCAATGGGGGGAACCCCTGAAGCAGCG
ACGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGTTCAGTAAGCAGGGAAAAATAAGCAGCAATGTG
ATGATGGTACCTGCCTAAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGGTGCAAGCG
TTGTTTCGGAATCATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGACATGTAAGTCAGGTGTGAAAACCTGCGGGCTC
AACTCGCAGCCTGCACTTGAAACTATGTGTCTGGAGTTTGGGAGAGGCAAGTGGAAATTCAGGTGTAGCG
GTGAAATGCGTAGATATCTGGAGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTTGCTGGCCTAACTGACGCTGAGCA
CGAAAGCGTGGGTAGTGAACGGGATTAATACCCCGGTATCCCGCCCTAACGTTGTCTACGTTGTTGGGG
TTTAACCCCTCAGTACGACCTACGGATAATAAACCCCTGGGGACTATGCTC

Figura 4 - Sequência de DNA do fragmento com 820 bp da hardjo (OMS) amplificada com os iniciadores 16sF/16sR.

CTCTGGCGCCGCCGCGGGGCCCCACCCGCGCGCCCCAACAACTACTCAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGA
GCTTAATCTTCTCTGAGTCTGGGATAACTTTCCGAAAGGGAAGCTAATACTGGATGGTCCCGAGAGATC
ATAAGATTTTTTCGGGTAAAGATTTATTGCTCGGAGATGAGCCCGCGTCCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTA
AAGCTACCAAGGCGACGATCGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTTCGGCCACAATGGAAGTGAAGACACGGT
CCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTTAAGAATCTTGCTCAATGGGGGGAACCCCTGAATCAACAACGCCCC
CTGGAAGAAAGAAAGGATTTCTGGGTGGTTGGGTCCTAAGCAGGGAAAAATAAGCAGCAATGTGATGATG
GTACCTGCCTAAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGGTGCAAGCGTTGTTT
GGAATCATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGACATGTAAGTCAGGTGTGAAAACCTGCGGGCTCAACTCG
CAGCCTGCACTTGAAACTATGTGTCTGGAGTTTGGGAGAGGCAAGTGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAAT
GCGTAGATATCTAGAAGCACCAAGTGGCGAAGGCGACTTGCTGGGCTGAAAACCTGACGCTGAAGTC
ACGACAGCGTGGGTAGTCGAACGTTATTAGGATACCCGGTAATTCACGCCCTAACGTTGTCTACCAAGTT
GTTTGGTGCTCTAACCCCTCACTCACTACCGACCGCACTAGGTGTACCG

Figura 5 - Sequência de DNA do fragmento com 820 bp da hardjo (CTG) amplificada com os iniciadores 16sF/16sR.

O sequenciamento do gene 16s rRNA tem sido utilizada como uma ferramenta de tipificação de isolados, certificação de painéis de leptospira, e aplicações taxonômicas (Morey et al, 2006; Perolat et al., 1994). Nesta pesquisa, a partir da amplificação com os primers 16sF/16sR, foi obtida a amplificação de um fragmento com 820 bp, para todas as amostras analisadas. O sequenciamento parcial das quatro amostras foi realizado no programa Blast® e na análise dos resultados a amostra Lagoa apresentou homologia com espécie *L. interrogans* e *L. borgpetersenii*, enquanto a amostra isolada Bolívia apresentou homologia com espécie *L. interrogans*. Possivelmente a amostra Bolívia pertença a sorovariedade hardjo genótipo hardjoprajitno, mas a espécie da amostra Lagoa devido à homologia encontrada ainda requer novos estudos. Segundo Clarridge

(2004), o sequenciamento completo da região 16s com aproximadamente 1500 bp pode ser necessário para distinguir a espécie de isolados. No entanto, para a maioria dos isolados o sequenciamento inicial de 500 bp proporciona diferenciação adequada para essa identificação. Está sendo conduzido um novo estudo para caracterização molecular das amostras de leptospira isoladas nesta pesquisa, no qual o sequenciamento completo dos isolados e suas caracterizações serão publicados em momento oportuno.

4.3 - Sorologia e Vacinação

A sorologia da primeira coleta de amostras de sangue em todos os bovinos do rebanho realizada em 13/09/2007 está representada na tabela 1. Os resultados revelaram altas porcentagens de animais positivos para as

sorovariedades hardjo genótipo hardjoprajitno e hardjobovis. Nessa sorologia as amostras de leptospiros isoladas (Lagoa e Bolívia) foram incluídas na prova sorológica e apresentaram

diferenças em suas porcentagens de reações. A amostra Lagoa apresentava reações que coincidiam com o genótipo hardjobovis e a amostra Bolívia com hardjoprajitno.

Tabela 1 - Frequência de aglutininas anti-Leptospira em 258 soros sanguíneos de bovinos. Fazenda Esperança. Santo Antônio do Monte, MG, 13/09/2007.

Sorovariedade	Amostra		
	Negativa	Positiva	% de Positiva
icterohaemorrhagiae	258	0	0,00
pomona	258	0	0,00
hardjobovis	134	124	48,06
hardjo (OMS)	163	95	36,82
hardjo (Norma)	163	95	36,82
Bolívia	163	95	36,82
Lagoa	133	125	48,45
mini	258	0	0,00
gryppothyphosa	258	0	0,00

A sorologia realizada pelo MAT, após a implementação do programa de vacinação, a partir de março de 2008, indicou queda gradativa dos percentuais de bovinos soropositivos (Tabela 2 a 4). Essa tendência também pode ser observada na figura 6,

que representa a evolução cronológica dos percentuais de bovinos positivos para as sorovariedades hardjobovis, hardjo (OMS), hardjo (Norma) e as duas amostras isoladas Bolívia e Lagoa.

Tabela 2 - Frequência de aglutininas anti-Leptospira em 236 soros sanguíneos de bovinos. Fazenda Esperança, Santo Antônio do Monte-MG, 25/11/2008. Após cinco meses da vacinação.

Sorovariedade	Amostra		
	Negativa	Positiva	% de Positiva
icterohaemorrhagiae	236	0	0,00
pomona	236	0	0,00
hardjobovis	164	72	30,51
hardjo (OMS)	165	71	30,08
hardjo (Norma)	165	71	30,08
Bolívia	165	71	30,08
Lagoa	164	72	30,51
mini	236	0	0,00
gryppothyphosa	236	0	0,00

Tabela 3 - Frequência de aglutininas anti-Leptospira em 176 soros sanguíneos de bovinos. Fazenda Esperança, Santo Antônio do Monte-MG, 16/06/2009. Após seis meses da vacinação.

Sorovariedade	Amostra		
	Negativa	Positiva	% de Positiva
icterohaemorrhagiae	176	0	0,00
pomona	176	0	0,00
hardjobovis	161	15	6,36
hardjo (OMS)	167	9	3,81
hardjo (Norma)	167	9	3,81
Bolívia	161	15	6,36
Lagoa	161	15	6,36
mini	176	0	0,00
gryppothyphosa	176	0	0,00

Tabela 4 - Frequência de aglutininas anti-Leptospira em 191 soros sanguíneos de bovinos. Fazenda Esperança, Santo Antônio do Monte-MG, 22/04/2010. Após quatro meses da vacinação.

Sorovariedade	Amostra		
	Negativa	Positiva	% de Positiva
icterohaemorrhagiae	191	0	0,00
pomona	191	0	0,00
hardjobovis	191	0	0,00
hardjo (OMS)	191	0	0,00
hardjo (Norma)	191	0	0,00
Bolívia	191	0	0,00
Lagoa	191	0	0,00
mini	191	0	0,00
gryppothyphosa	191	0	0,00

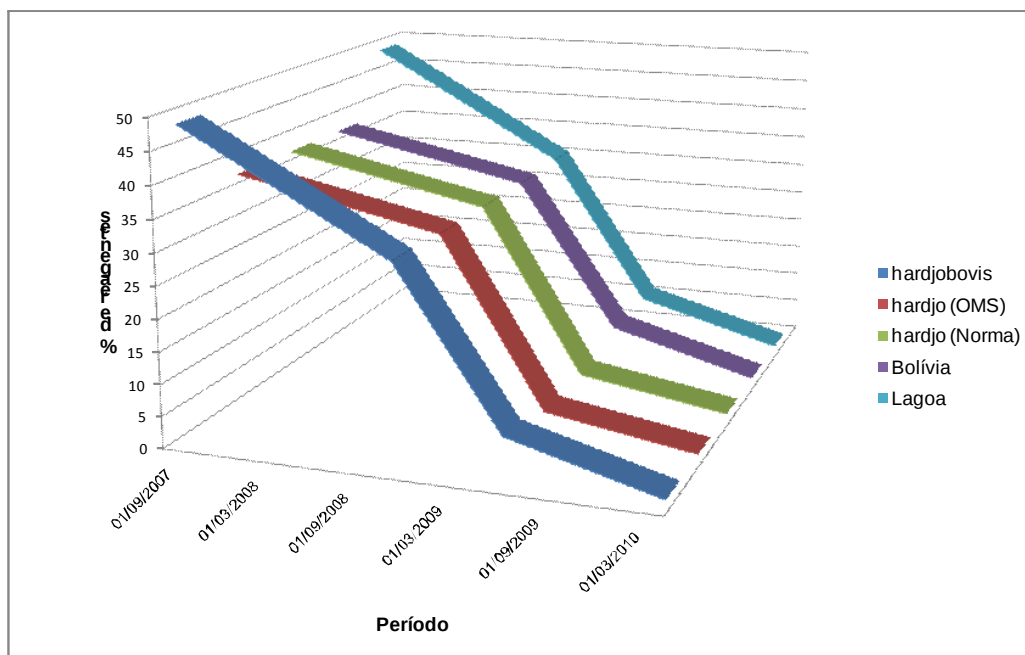


Figura 6 – Evolução cronológica do percentual de bovinos positivos frente às sorovariedades hardjo e amostras Bolívia e Lagoa, no período de 13/09/2007 a 22/04/2010. Fazenda Esperança, Santo Antônio do Monte – MG.

No MAT realizados de 2007 a 2009, a análise do banco de dados revelou o aparecimento de novas infecções, mas que seguramente foram controladas através da vacinação, tendo em vista o resultado da última sorologia realizada em 22/04/2010 em que não foi encontrado nenhum animal reagente.

A distribuição dos títulos positivos de soro de bovinos avaliados pelo MAT frente às sorovariedades hardjobovis, hardjo (OMS), hardjo (Norma) e as duas amostras isoladas Bolívia e Lagoa no período de 13/09/2008 a 22/04/2010 estão representadas nas tabelas 5 a 9. Em 22/04/2010 ocorreu a soroconversão de todos os animais testados, havendo somente sete (3,66%) reações do total de 191 com títulos de 1:50, que nesta pesquisa não foi considerada como uma reação positiva. Pode ser observado na sorologia realizada em 13/09/2007 que houve grande número de animais positivos que apresentaram reação iguais ou acima de 1:400, que segundo

Faine et al. (1999) evidenciam que houve contato recente dos animais com *L. hardjo* e que poderiam, em alguns casos, evoluir para doença.

Confrontando os dados dos animais que abortaram de 2007 a 2009 e que estavam positivos na sorologia e os seus títulos, foi observado que nesse período ocorreram 32 abortos, dos quais 25 (75%) ocorreram de animais que estavam positivos na sorologia para sorovariedade hardjo. As titulações das 25 reações positivas variaram de 1:100 à 1:25600, dessas, foram 17 (68%) reações de titulação de 1:100, três (12%) reações de 1:200, uma (4%) reação de 1:400, uma (4%) reação de 1:1600, duas (8%) reações 1:12800 e uma (4%) reação 1:25600. Esse dados estão de acordo com os relatos de Ellis (1994) que menciona que a maioria dos casos de aborto provocados por hardjo estão associados a baixos títulos de anticorpos no MAT com reações iguais ou menores que 1:100.

Tabela 5 - Distribuição dos títulos positivos de soro de bovinos avaliados pelo MAT frente à sorovariedade hardjobovis, no período de 13/09/2007 a 22/04/2010. Fazenda Esperança, Santo Antônio do Monte - MG.

Data	hardjobovis									
	1:100		1:200		1:400		1:800		≥1:1600	
	P	%	P	%	P	%	P	%	P	%
13/09/2007	81	31,40	10	3,88	4	1,55	1	0,39	28	10,85
25/11/2008	10	4,24	22	9,32	20	8,47	16	6,78	0	0,00
16/09/2009	4	2,27	8	4,55	3	1,70	0	0,00	0	0,00
22/04/2010	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00

Tabela 6 - Distribuição dos títulos positivos de soro de bovinos avaliados pelo MAT frente à sorovariedade hardjo (OMS), no período de 13/09/2007 a 22/04/2010. Fazenda Esperança, Santo Antônio do Monte - MG.

Data	hardjo (OMS)									
	1:100		1:200		1:400		1:800		≥1:1600	
	P	%	P	%	P	%	P	%	P	%
13/09/2007	55	21,32	11	4,26	5	1,94	2	0,78	22	8,53
25/11/2008	31	13,14	30	12,71	7	2,97	3	1,27	0	0,00
16/09/2009	9	5,11	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
22/04/2010	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00

Tabela 7 - Distribuição dos títulos positivos de soro de bovinos avaliados pelo MAT frente à sorovariedade hardjo (Norma), no período de 13/09/2007 a 22/04/2010. Fazenda Esperança, Santo Antônio do Monte - MG.

Data	hardjo (Norma)									
	1:100		1:200		1:400		1:800		≥1:1600	
	P	%	P	%	P	%	P	%	P	%
13/09/2007	55	21,32	8	3,10	4	1,55	0	0,00	28	10,85
25/11/2008	32	13,56	29	12,29	7	2,97	3	1,27	0	0,00
16/09/2009	9	5,11	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
22/04/2010	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00

Tabela 8 - Distribuição dos títulos positivos de soro de bovinos avaliados pelo MAT frente à amostra Bolívia, no período de 13/09/2007 a 22/04/2010. Fazenda Esperança, Santo Antônio do Monte - MG.

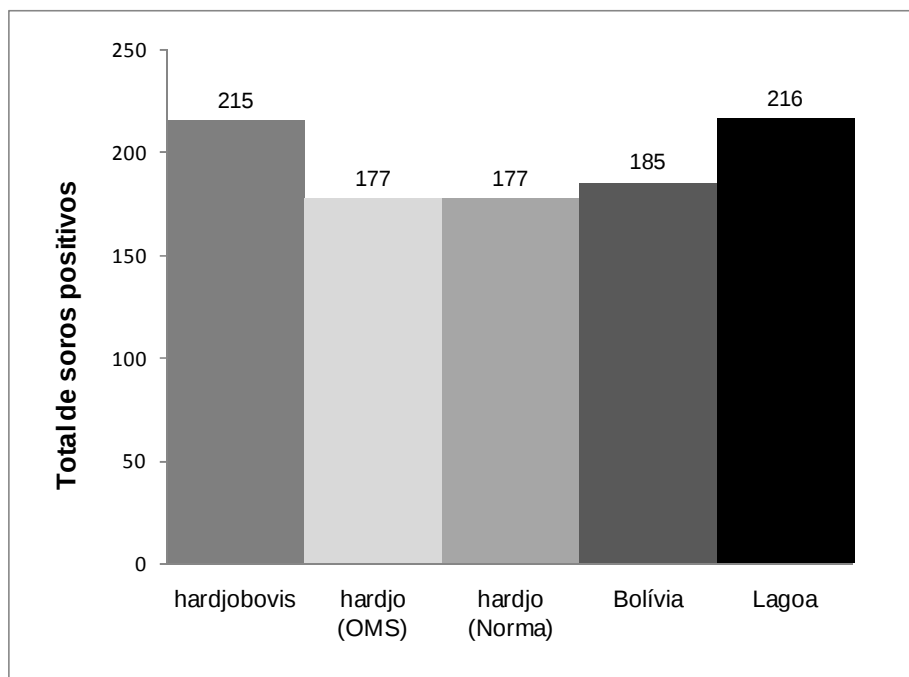
Data	Bolívia									
	1:100		1:200		1:400		1:800		≥1:1600	
	P	%	P	%	P	%	P	%	P	%
13/09/2007	54	20,93	9	3,49	4	1,55	0	0,00	28	10,85
25/11/2008	9	3,81	3	1,27	24	10,17	12	5,08	23	9,75
16/09/2009	1	0,57	4	2,27	4	2,27	6	3,41	0	0,00
22/04/2010	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00

Tabela 9 - Distribuição dos títulos positivos de soro de bovinos avaliados pelo MAT frente à amostra Lagoa, no período de 13/09/2007 a 22/04/2010. Fazenda Esperança, Santo Antônio do Monte - MG.

Data	Lagoa									
	1:100		1:200		1:400		1:800		≥1:1600	
	P	%	P	%	P	%	P	%	P	%
13/09/2007	80	31,01	11	4,26	5	1,94	1	0,39	28	10,85
25/11/2008	10	4,24	13	5,508	27	11,44	8	3,39	14	5,93
16/09/2009	0	0,00	4	2,27	5	2,841	6	3,41	0	0,00
22/04/2010	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00

A comparação da reatividade dos soros positivos está apresentada na figura 7. Observa-se que amostra isolada Lagoa reagiu a 216 (100%) soros positivos. Hardjobovis teve reações sorológicas para 215 (99,54%) dos soros positivos, enquanto que a amostra isolada Bolívia 185 (85,64%). A hardjo (Norma) e hardjo (OMS) apresentaram reatividade sorológica para 177 (81,94%) dos soros. O cálculo de χ^2

dos soros reagentes para hardjobovis, hardjo (OMS), hardjo (Norma), amostra Lagoa e amostra Bolívia revelaram nível de significância estatística ($P=0,034$). Quando o cálculo do χ^2 foi realizado individualmente os soros reagentes apresentaram diferenças entre as reações com a sorovariedades hardjo (Norma) e hardjo (OMS), com a amostra Lagoa ($P=0,026$) e hardjobovis($P=0,03$).



$$\chi^2=10,41 \quad (P=0,034)^*$$

* Valores referentes às sorovariedades hardjobovis, hardjo (OMS), hardjo (Norma), amostra Lagoa e amostra Bolívia.

Figura 7 - Comparação da reatividade sorológica utilizando o MAT na diluição $\geq 1:100$ em 899 soros de bovinos. Total de 216/899 soros apresentaram reatividade sorológica para pelo menos 1 dos 5 genótipos hardjo testados. Período de 13/05/2007 a 22/04/2010. Fazenda Esperança, Santo Antônio do Monte – MG.

No presente estudo, resultados positivos na sorologia com aglutininas anti-hardjo, assim como o isolamento da sorovariedade hardjo a partir da amostra de urina de duas vacas, que apresentavam histórico de aborto e sangue no leite, confirmaram que, apesar de dois anos do programa de vacinação anteriormente instituído, a doença não havia sido controlada.

De acordo com os registros da propriedade, o rebanho da Fazenda Esperança estava submetido a um programa de vacinação semestral, entretanto os animais vacinados continuavam a apresentar casos de aborto, repetições de cio, natimortos, nascimento de bezerros fracos e queda na produção do leite em abril de 2007.

A técnica de MAT foi utilizada para identificação prévia das duas amostras isoladas e para acompanhamento sorológico do rebanho após a implantação de novo esquema de vacinação. Em dois anos de investigação, nos resultados obtidos em mais de 200 reações sorológicas positivas, as amostras isoladas, que foram denominadas Bolívia e Lagoa, tinham reações cruzadas com as sorovariedades hardjo genótipos hardjobovis e hardjoprajitno. Esses resultados são suficientes para assegurar que os isolados pertencem ao sorogrupo Serjoe e a sorovariedade hardjo. É provável se tratar de amostras diferentes tendo em vista que as reações sorológicas das duas não coincidem em seus valores de porcentagem. Conforme os resultados da sorologia pode-se presumir que a Lagoa pertença à espécie

L. borgpetersenii e genótipo hardjobovis e a amostra Bolívia pertença à espécie *L. interrogans* e genótipo hardjoprajitno.

Além das diferenças sorológicas encontradas no MAT entre as amostras Bolívia e Lagoa, outro fator indicativo de que a amostra Lagoa pertença ao genótipo hardjobovis é que a vacina elaborada com genótipo hardjoprajitno, com ausência do genótipo hardjobovis, anteriormente aplicada no rebanho, mostrou que essa bacterina não levou a uma resposta imunológica eficaz e, portanto não promoveu o controle da doença. Os animais apresentaram, mesmo após a vacinação periódica, sinais clínicos sugestivos e altos títulos para a sorovariedade hardjo. E após introdução da vacinação com as amostras isoladas na propriedade houve controle da doença no rebanho. Embora os genótipos hardjobovis e hardjoprajitno pertençam à mesma sorovariedade, nas vacinas eles não induzem imunidade cruzada (Bolin et al., 1989), isto é, uma vacina com genótipo hardjoprajitno não leva uma resposta imune satisfatória de um rebanho infectado por hardjobovis.

A ocorrência de duas ou mais sorovariedades infectando animais de um mesmo rebanho ao mesmo tempo foi relatada poucas vezes na literatura. No Brasil foi descrita na pesquisa de Moreira (1994), na qual isolou as sorovariedades mini e hardjo a partir da urina de bovinos de aptidão leiteira.

No Brasil a leptospirose é endêmica em bovinos, e já foi detectada por inúmeros pesquisadores em praticamente todas as regiões do país (Pellegrin et al., 1999; Homem et al., 2000; Langoni et al., 2000; Araújo et al., 2005; Oliveira e Pires Neto, 2004). Nestes estudos soroepidemiológicos a sorovariedade hardjo tem se apresentado como a mais freqüente. Na maioria dessas pesquisas, o genótipo hardjobovis não é utilizado como antígeno no MAT. Provavelmente algumas dessas reações com genótipo hardjoprajitno sejam reações cruzadas com o genótipo hardjobovis, pois ambos possuem antígenos comuns.

Em Minas Gerais, a hipótese da existência da sorovariedade hardjo infectando os bovinos foi investigada e posteriormente foi confirmada através do primeiro isolamento e tipificação da hardjo, genótipo hardjoprajitno, no país (Moreira, 1994). Confirmando a hipótese do pesquisador de que essa sorovariedade seria a principal leptospira responsável por problemas reprodutivos em bovinos no Brasil.

Apesar de a sorovariedade wolffi ser encontrada com freqüência nos inquéritos sorológicos do Brasil (Langoni et al., 2000; Oliveira e Pires Neto, 2004), ainda não foram encontradas publicações científicas ou técnicas com registros do isolamento dessa sorovariedade em bovinos nos casos clínicos e subclínicos sugestivos de leptospirose (Araújo et al., 2005). A sorovariedade wolffi apresenta afinidade antigênica com as sorovariedades hardjo, revelada pela alta taxa de reações cruzadas nos testes de microaglutinação, além de induzir títulos de anticorpos aglutinantes e reação cruzada nas vacinas (Costa et al., 1998; Arduino et al., 2009).

A vacinação tem sido descrita como a melhor ferramenta disponível para o controle da leptospirose em bovinos, pois reduz a ocorrência da infecção e os problemas reprodutivos relacionados à hardjo (Dhaliwal et al., 1996a). Entretanto, não é possível a proteção adequada de um rebanho se as amostras predominantes na espécie bovina não estiverem incluídas (Bolin et al., 1989).

Na presente investigação, a bacterina contendo as amostras de leptospira isoladas na propriedade foi eficaz no controle da leptospirose em rebanho leiteiro. Nos bovinos, o principal mecanismo de transmissão da sorovariedade hardjo é a direta, isto é bovino-bovino (Ellis et al., 1981; Ribeiro, 1988). Provavelmente houve um bloqueio nesse mecanismo de transmissão, permitindo o controle da doença.

Para o controle da doença no rebanho com o programa de vacinação utilizado foram necessários 25 meses para que houvesse

100% de resultados negativos na prova sorológica. Resultado muito semelhante foi encontrado por Moreira (1994).

A partir da implantação do programa de vacinação observou-se a diminuição dos casos de aborto e mastites, havendo queda gradativa do percentual de bovinos positivos na sorologia, revelando tendência decrescente chegando resultados totalmente negativos em 22/04/2010.

No rebanho estudado, a aquisição contínua de novilhas e reprodutoras, foi possivelmente um fator importante na introdução da leptospirose no rebanho. Bennett (1993) cita também outros fatores de riscos como: pastagem simultânea com bovinos infectados, o uso de touros infectados em coberturas naturais e acesso de bovinos a água contaminada, como riachos, rios ou água de drenagem.

As vacinas anti-*Leptospira* conferem principalmente uma proteção por anticorpos da classe IgG que atuam nos epítomos presentes no envelope externo do microrganismo. De acordo com Dhaliwal et al. (1996a) a melhora nos índices reprodutivos do rebanho após a vacinação, fato esse também observado neste trabalho, pode ser resultado da transudação da IgG no útero, resultando na eliminação da infecção uterina.

As vacinas anti-leptospira produzidas com antígeno inativado são imunógenos fracos, gerando resposta imune apenas do tipo humoral, em muitas ocasiões com baixo título de anticorpos e que persistem por um curto período de tempo (Bolin et al., 1989). Em estudo recente avaliou-se bacterinas polivalentes produzidas comercialmente para bovinos e uma vacina monovalente produzida com a sorovariedade hardjo. Foi encontrado resultados superiores de tempo de duração de títulos de anticorpos protetores para vacina monovalente. Enquanto as bacterinas polivalentes exigem no mínimo revacinações a cada quatro meses a bacterina monovalente exige revacinações a cada seis meses (Rodrigues, 2008).

As vacinas elaboradas com sorovariedades mais prevalentes do local ou com amostras autóctones como a elaborada neste estudo, provavelmente produzem resposta imunológica superior quando comparada às vacinas polivalentes normalmente produzidas para uso comercial. Fato que coincide com observado no estudo de Bolin e Alt (2001), no qual uma vacina monovalente com genótipo hardjobovis protegeu o gado da colonização renal e leptospiúria por quatro meses após a vacinação. Enquanto que em outro estudo Bolin et al. (1989) observaram que vacina pentavalente contendo o genótipo hardjoprajitno falharam em proteger contra a infecção adquirida após o desafio com genótipo hardjobovis.

O mais indicado na elaboração para as vacinas anti-leptospira seria a formulação com o menor número possível de sorovariedades, dando-se especial ênfase para aquelas que realmente estejam presentes na região (Moreira, 2004; Araujo et al., 2005). Nas vacinas anti-leptospira comerciais são incluídas várias sorovariedades que não possuem importância epidemiológica para espécie bovina, o que poderia estar levando a uma vacinação ineficaz (Rodrigues, 2008).

4.4 - Eficiência Reprodutiva e Produtiva

Analisando-se os índices zootécnicos do rebanho representados na tabela 10 e comparando-os com os parâmetros de fertilidade desejáveis para um rebanho leiteiro segundo Radostits e Blood (1986), verifica-se que em 2008, o desempenho reprodutivo dos animais apresentou melhora e se igualou aos índices reprodutivos desejáveis. O intervalo entre partos (IP), período de serviço (PS) e período de lactação (PL) apresentaram diminuição dos índices em 2008. Na análise estatística do IP, PS e PL, os anos de 2007 e 2008 apresentaram diferenças significativas. O ano de 2009 não foi apresentado devido ao pequeno número de observações, uma vez que os dados foram coletados apenas nos primeiros quatro meses do ano de 2010, quando se encerrou o experimento,

impossibilitando o cálculo com uma amostra significativa.

Houve uma queda expressiva na taxa de abortos comparando o ano de 2007, quando ocorreu o surto da doença na propriedade, em relação ao ano de 2009, quando a doença já estava controlada (Tabela 10). Na análise estatística pelo cálculo do χ^2 , a taxa de aborto nos anos de 2007 e 2009 apresentou diferenças significativas ($P=0,02$). Avaliando-se a produção de leite, houve um aumento significativo da produção, podendo também ter ocorrido devido a outras variáveis como melhorias nas condições de manejo nutricional,

reprodutivo e sanitário do rebanho. Analisando os dados com o cálculo do χ^2 para produção de leite, os anos de 2007 e 2009 apresentaram diferenças altamente significativas ($P=0,0005$).

Não houve diferença estatística significativa na taxa de concepção ao primeiro serviço entre os anos de 2007, 2008 e 2009, no entanto nota-se que esse percentual foi acentuadamente baixo em 2008 (41,61%). Possivelmente a leptospirose ainda não havia sido controlada e ainda existiam animais positivos com sinais clínicos da doença.

Tabela 10 – Índices zootécnicos do rebanho leiteiro, no período de 2007 a 2009. Fazenda Esperança, Santo Antônio do Monte – MG.

Ano	Índices Zootécnicos											
	IP (meses)	N	PS (dias)	N	PL (meses)	N	Taxa de Aborto (%)	N	TC (%)	N	PrL/dia (L)	N
2007	14 ^a	89	124 ^a	89	12 ^a	89	12,50 ^a	120	50,34 ^a	145	800 ^a	77
2008	12 ^a	80	86 ^b	80	10 ^b	80	7,15 ^{a,b}	126	41,61 ^a	149	1300 ^a	103
2009	–	–	–	–	–	–	4,79 ^b	167	54,77 ^a	199	2100 ^b	120

Letras iguais numa mesma coluna indicam igualdade estatística com $p \leq 0,05$.

Para análise do PS foi utilizado o teste Kruskal-Wallis e para análise do IP e PL foi utilizado o teste T student, para as outras variáveis foi calculado χ^2 .

IP – Intervalo entre partos, PS- Período de serviço, PL – Período de lactação, PrL/dia – Produção de leite/dia

TC – Taxa de concepção ao primeiro serviço

(-) Dados insuficientes

A avaliação do desempenho reprodutivo e produtivo é importante em propriedades de bovinos de leite para definir estratégias de manejo voltadas para produtividade do rebanho. Para tanto, é necessário a realização de escrituração zootécnica, que são anotações de controle do rebanho, registrando-se data de nascimento, inseminações, partos, mortes, descartes, pesagens, período de gestação, e na sequência transformar esses dados em índices úteis como intervalo entre partos, período de serviço e número de serviços por concepção.

Na propriedade em estudo essas anotações eram desempenhadas de forma manual, porém muitos índices não puderam ser calculados devido às deficiências de informações.

Apesar da eficiência reprodutiva e produtiva de um rebanho ser uma variante multifatorial (Azevedo et al., 2001; Dhaliwal et al. 1996b), foi observado melhora nos índices reprodutivos e de produtividade, como diminuição da taxa de aborto, diminuição do intervalo entre partos e aumento da produção de leite.

Comparando os índices de 2007, ano em que ocorreu o surto da doença na propriedade, aos índices de 2008 e 2009, quando foi implementado o novo programa de vacinação com bacterina autóctone, houve uma melhora significativa nos índices reprodutivos do rebanho. Resultado semelhante foi relatado por Dhaliwal et al. (1996a) em um rebanho com alta prevalência de infecção por hardjo, no qual foi demonstrado que os problemas reprodutivos associados a leptospirose podem ser controlados através da vacinação.

A análise dos índices zootécnicos e o pareamento com o resultados da sorologia indicaram associação de animais positivos para leptospirose com infertilidade. Em 2008 a taxa de concepção ao primeiro serviço foi expressivamente baixa (41,61%), segundo Radostits e Blood (1986) esta taxa deveria ser de 70%, estando muito abaixo dos parâmetros considerados normais. Muitos animais que apresentaram resultados positivos na sorologia e abortaram em 2007, não ficaram prenhes em 2008. Em 2009 houve melhora na taxa de concepção ao primeiro serviço (54,77%), que coincidiu com o controle da doença na propriedade, no entanto ela continuou apresentando valor abaixo do esperado. A infertilidade associada à infecção por hardjo também foi relatada por Quilan e McNicholl (1993) que encontraram taxa de concepção ao primeiro serviço de 49%. Segundo esses autores a *L.hardjo* pode persistir nas tubas uterinas dos animais infectados assim como nos rins, podendo afetar a fertilidade do rebanho causando morte embrionária precoce com reabsorção ou abortos não detectados.

Neste estudo o PS apresentou uma média de 124 dias em 2007. Radostits e Blood (1986) consideram ideal um PS de aproximadamente de 85 dias, para que se alcance um IP de 12 meses ou uma cria por ano. O período de serviço longo está intimamente relacionado à atrasos na involução uterina pós-parto devido à infecções uterinas, retenções de placenta, bem como a fatores de manejo como deficiências nutricionais e problemas sanitários (Azêvedo et al., 2001).

Possivelmente a infecção por hardjo pode ter colaborado para o aumento desse índice, pois o aborto causado por este agente pode consequentemente ocasionar a retenção de placenta nos bovinos (Ellis et al., 1986).

O IP e o PL apresentaram média de 14 e 12 meses respectivamente em 2007, que são consideradas altas segundo parâmetros de Radostits e Blood (1986), no qual consideram ideal o IP de 12 meses. O longo intervalo entre partos diminui a produção de leite por dia, reduz o número de vacas em lactação no rebanho, consequentemente levando a perdas na produção leiteira. O PL está diretamente relacionado à produção de leite dos animais e interage com IP interferindo na eficiência de produção. Se o IP for de 12 meses (ideal), o PL deverá ser de 10 meses (Azêvedo et al., 2001).

No presente estudo foi observada alta associação da infecção por hardjo e transtornos reprodutivos em bovinos leiteiros. Em 2007, dos quinze animais que abortaram apenas três (20%) estavam negativos na sorologia e doze (80%) estavam positivos. Em 2008, dos nove animais que abortaram, sete (77%) estavam positivos e dois (23%) negativos. Em 2009, ocorreram oito abortos, desses, seis (75%) eram de animais positivos na sorologia, e apenas dois (25%) negativos. A correlação entre a leptospirose e interferência nos índices reprodutivos do rebanho também foi relatada nas pesquisas de Mineiro et al. (2007), Dhaliwal et al. (1996b) e Quilan e McNicholl (1993).

A baixa produtividade de leite causada pela infecção por hardjo pode ser minimizada através da vacinação. Fato que foi evidenciado pela melhora significativa na produção de leite do rebanho após os dois anos de implantação do programa de controle com bacterina autóctone.

As leptospiroses causam sérios prejuízos econômicos à bovinocultura nacional. Os maiores obstáculos com relação à prevenção e ao controle da doença são a ausência de diagnóstico e testes confirmatórios eficazes associados à falta

de informação, tanto da população como dos profissionais. À medida que existir maior interesse e incentivo dos órgãos responsáveis pelo diagnóstico e avaliação de medidas de controle, ocorrerá à redução do número de casos da doença nos animais, consequentemente reduzindo os prejuízos que a doença causa nos rebanhos bovinos de corte e leite.

5 – CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

- As amostras de leptospiros isoladas pertencem ao sorogrupo Serjoe e sorovariedade hardjo.
- As diferenças encontradas na sorologia indicam que a amostra Lagoa pertença à espécie *L. borgpetersenii* e genótipo hardjobovis e amostra Bolívia à espécie *L. interrogans* genótipo hardjoprajitno.
- No sequenciamento do fragmento de 820 bp da amostra Bolívia amplificados pelos iniciadores da região 16S que codifica para o RNA ribossomal, foi encontrada homologia apenas com a espécie *L. interrogans*, indicando que sua classificação seja espécie *L. interrogans* genótipo hardjoprajitno.
- A vacina experimental elaborada com as amostras autóctones foi eficiente no controle da leptospirose no rebanho bovino.
- A sorologia do rebanho bovino realizada pela técnica de microaglutinação permitiu avaliar a evolução do controle e da ocorrência de novas infecções por leptospirose no rebanho.
- O desempenho reprodutivo e produtivo do rebanho apresentou melhora após introdução do programa de controle com vacina autóctone.

6 - REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ARAUJO, V.E.M.; MOREIRA, E.C.; NAVEDA, L.A.B. et al. Frequência de aglutininas anti-*Leptospira interrogans* em soros sanguíneos de bovinos, em Minas Gerais, de 1980 a 2002. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, n.4, p.430-435, 2005.
- ARDUINO, G.G.C.; GIRIO, R.J.S.; MAGAJEVSKI, F.S. et al. Títulos de anticorpos aglutinantes induzidos por vacinas comerciais contra leptospirose bovina.. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 29, n.7, p. 575-582, 2009.
- AZÊVEDO, D.M.M.R.; AZÊVEDO, A.R.; ALVEZ, A.A. Eficiência reprodutiva em bovinos de leite. *Rev. Cient. Prod. Anim.*, v.3, n.2, p. 48-61, 2001.
- BENNETT, R.M. Decision support models of leptospirosis in dairy herds. *Vet. Rec.*, v.132, n.3, p.59-61,1993.
- BOLIN, C.A.; THIEMANN, A.B.; HANDSAKER, A.L. et al. Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine on *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjo-bovis infection on pregnant cattle. *Am. J. Vet. Res.*, v.50, n.1, p.161-165, 1989.
- 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. *Am. J. Vet. Res.* v.62, n.7, p.995-1000, 2001.
- BULACH, D.M; ZUERNER, R.L.; WILSON, P. et al. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. *PNAS*, v.103, n.39, p.14560-14565, 2006.
- CLARRIDGE, J. E., III. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 17, n.4, p.840-862, 2004.

- COSTA, M.C.R.; MOREIRA, E.C.; LEITE, R.C.; et al. Avaliação da imunidade cruzada entre *Leptospira hardjo* e *L. wolffi*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 50, n. 1, p. 11-17, 1998.
- DHALIWAL, G.S.; MURRAY, R.D.; DOBSON, H. et al. Effect of vaccination against *Leptospira interrogans* serovar hardjo on milk production and fertility in dairy cattle. *Vet. Rec.*, v.138, n.14, p.334-335, 1996a.
- DHALIWAL, G. S.; MURRAY, R. D.; DOBSON, H.; et al. Reduced conception rates in dairy cattle associated with serological evidence of *Leptospira interrogans* serovar hardjo infection. *Vet. Rec.*, p. 110-114, 1996b.
- ELLINGHAUSEN H.C.; McCULLOUGH, W.G. Nutrition of *Leptospira pomona* and growth of 13 other serotypes: fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80. *Am. J. Vet. Res.* v.26, p. 45-51, 1965.
- ELLIS, W.A.; O'BRIEN, J.J.; CASSELLS, J. Role of cattle in the maintenance of *Leptospira interrogans* serotype hardjo infection in North Ireland. *Vet. Rec.* v.108, p.555-557, 1981.
- ELLIS, W.A.; SONGER, J.G.; MONTGOMERY, J.M. et al. Prevalence of *Leptospira interrogans* serovar hardjo in the genital tracts of non-pregnant cattle. *Vet. Rec.*, v.113, p.11-13, 1986.
- ELLIS, W.A. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. *Vet. Clin. North Am.: Food Anim. Pract.*, v.10, n.3, p.463-478, 1994.
- FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C. et al. *Leptospira and leptospirosis*. Melbourne:Medi Sci. 1999, 272 p.
- FREITAS, D.C.; LACERDA JÚNIOR, P.M.G.; VEIGA, J.S. et al. Identificação da leptospirose bovina no Brasil. *Rev. Fac. Med. Vet. Zoot.*, v.6, n.1, p.81-83, 1957.
- FREITAS, J.C.; SILVA, F.; OLIVEIRA, R.C. Isolamento de *Leptospira* spp. de cães, bovinos e suínos naturalmente infectados. *Ciênc. Rur.*, v.34, n.3, p.853-856, 2004.
- FUKUNAGA, M.; MIFUCHI, I. Unique organization of *Leptospira interrogans* rRNA Genes. *J. Bact.*, v. 171, n. 11, p. 5763-5767, 1989.
- FUKUNAGA, M.; HORIE, I.; MIFUCHI, I. Nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Leptospira interrogans* serovar canicola strain moulton. *Nucleic Acids Res.*, v. 18, n. 2, p. 366, 1989.
- GALTON, M.M.; SULZER, C.R.; SANTA ROSA, C.A.; FIELDS, M.J. Application of a microtechnique to the agglutination test for leptospiral antibodies. *Appl. Microbiol.*, v.13,n.1, p.81-85, 1965.
- GRÉGOIRE, N.; HIGGINS, R.; ROBINSON, Y. Isolation of leptospires from nephritic kidneys of beef cattle at slaughter. *Am. J. Vet. Res.*, v.48, p.370-371, 1987.
- CENSO Agropecuário 2006. Efetivo/rebanho, Brasil, MG. [s.l.]: IBGE, [2006]. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br.html>>. Acesso em: 06 de abr. 2009.
- HIGGINS, R.J.; HARBOURNE, J.F.; LITTLE, T.W.A. Mastitis and abortion in dairy cattle associated with *Leptospira* of the serotype hardjo. *Vet. Rec.*, v.107, p.307-310, 1980.
- HOMEM, V.S.F.; HEINEMANN, M.B.; MORAES, Z.M. et al. Leptospirose bovina em Uruará, PA, município da Amazônia Oriental. *Arqs Inst. Biol.*, v.67, n.1, p.1-8, 2000.
- KINGSCOTE, B.F. *Leptospira interrogans* serovar hardjo infection in cattle in the southern Okanagan district of British Columbia. *Can. Vet. J.*, v. 26, n.10, p.328-332, 1985.

- LANGONI, H.; MEIRELES, L.R.; GOTTSCHALK, S. et al. Perfil sorológico da leptospirose bovina em regiões do Estado de São Paulo. *Arq. Inst. Biol.*, v.67, p.37-41, 2000.
- LEVETT, P.N. Leptospirosis. *Clin. Microbio. Ver.*, v.14, n.2, p.296-326. 2001.
- MINEIRO, A.L.B.B.; BEZERRA, E.E.A.; VASCONCELLOS, S.A. et al. Infecção por leptospira em bovinos e sua associação com transtornos reprodutivos e condições climáticas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.59, n 5; p. 1103-1109, 2007.
- MYERS, D.M.; JELAMBI, F. Isolation and identification of *Leptospira hardjo* from cattle in Argentina. *Trop. Geogr. Med.*, v.27, p.63-70, 1975.
- MOREIRA, E.C. *Avaliação de métodos para erradicação de leptospiroses em bovinos*. 1994. 94f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- MOREIRA, E.C. Leptospirose: Dificil erradicação. *Cultivar Bov.*, n.10. p.25-28, 2004.
- MOREY, R.E.; GALLOWAY, R.L.; BRAGG, S.L.; et al. Species-Specific Identification of Leptospiraceae by 16S rRNA Gene Sequencing. *J. Clin. Microbio.*, v.44, n.10, p.3510-3516, 2006.
- OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Chapter 2.1.9. *Leptospirosis*. Disponível em: <<http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>>. Acessado em 06 de fev. 2011.
- OLIVEIRA, S.J.; PIRES NETO, J.A.S. Aspectos etiológicos e diagnóstico nas leptospiroses. *Rev. CFMV*, v.10, n.33, 2004.
- PEROLAT, P.; MERIEN, F.; ELLIS, W. A. et al. Characterization of *Leptospira* Isolates from Serovar Hardjo by Ribotyping Arbitrarily Primed PCR, and Mapped Restriction Site Polymorphisms. *J. Clin. Microbio.* v. 32, n. 8, p. 1949-1957, 1994.
- PELLEGRIN, A.O.; GUIMARÃES, P.H.S.; SERENO, J.R.B. et al. *Prevalência da Leptospirose em Bovinos no Pantanal Matogrossense*. Corumbá: Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal/EMBRAPA, 1999. 10P. (EMBRAPA-CPAD – Comunicado Técnico, n.22).
- PREFEITURA MUNICIPAL DE SANTO ANTÔNIO DO MONTE. Porque investir em Santo Antônio do Monte. Disponível em: <<http://www.samonte.mg.gov.br>>. Acesso em: 06 de abr. de 2009.
- PRESCOTT J.F.; MILLER R.B.; NICHOLSON V.M. Isolation of *Leptospira hardjo* from kidneys of Ontario cattle at slaughter. *Can. J. Vet. Res.*, v.51, p.229–231, 1987.
- QUINLAN, J.F.; MCNICKOLL, V.J. Agalactia and infertility due to *Leptospira interrogans* serovar hardjo infection in a vaccinated dairy herd. *Ir. Vet. J.*, v.46, n.3, p.97-98, 1993.
- RALPH, D.; McCLELLAND, M.; WELSH, J. et al. *Leptospira* Species Categorizes by Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction (PCR) and by Mapped Restriction Polymorphisms in PCR-Amplified rRNA Genes. *J. Bacter.*, v. 175, n. 4, p. 973-981, 1993.
- RADOSTITS, O. M; BLOOD, D. C. *Manual de controle da saúde e produção dos animais*. São Paulo: Editora Manole, 1986. 530p.
- RIBEIRO, S.C.R. *Alguns aspectos da infecção por Leptospira interrogans, numa fazenda de Minas Gerais, Brasil*. 1988. 42 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal Minas Gerais, Belo Horizonte.

RODRIGUES, R.O. *Imunogenicidade de bacterinas anti-leptospiras para bovinos produzidas no Brasil, 2006/7*. 2008.145 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal Minas Gerais, Belo Horizonte.

SAMBROOK, J.; FRISTSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, p.11.48-11.51, 1989.

SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicvacina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221 p.

SANTA ROSA, C.A.; CASTRO, A.F.P.; TROISE, C. Isolamento de *L. icterohaemorrhagiae* de bovino em São Paulo. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v. 28, p.113-118, 1961.

SANTA ROSA, C.A.; SULZER, C.R.; CASTRO, A.F.P. et al. Two new serovars in the hebdomadis group isolated from cattle in Brazil. *Inter. J. Zoonoses.*, v. 7, p. 158-163, 1980.

YASUDA, P.H.; STEIGERWALT, A.G.; SULZER, K.R. et al. Deoxyribonucleic Acid Relatedness between Serogroups and Serovars in the Family Leptospiraceae with Proposals for Seven New Leptospira Species. *Int. J. Syst. Bact.*, v.37, n.4, p.407-415, 1987.

ZACARIAS, F.G.S.; VASCONCELLOS, S.A.; ANZAI, E.K. et al. Isolation of leptospira Serovars Canicola and Copenhageni from cattle urine in the state of Paraná, Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, v.39, n.4, p. 744-748, 2008.

7 – ANEXO

Anexo 1 - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 163/2008**, relativo ao projeto intitulado **"Epidemiologia e controle da Leptospirose bovina causada por genótipo Hardjobovis em fazenda leiteira em Minas Gerais"**, que tem como responsável(is) **Élvio Carlos Moreira**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **10/ 09/2008**.

Este certificado expira-se em **10/ 09/ 2013**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 163/2008**, related to the project entitled **"Epidemiology and control of bovine leptospirosis caused to hardjobovis genotype in dairy farm in Minas Gerais"**, under the supervisors of **Élvio Carlos Moreira**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **September 10, 2008**.

This certificate expires in **September 10, 2013**.

Belo Horizonte, 15 de Setembro de 2008.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)