



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**DETECÇÃO DE ANTICORPOS E PESQUISA DE DNA DE
Leptospira spp. E *Brucella* spp. EM BOVINOS ABATIDOS
NO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE**

KÊNIA SUÊNIA MEIRA DE ARAÚJO

Médica Veterinária

MOSSORÓ-RN- BRASIL
AGOSTO-2012

KÊNIA SUÊNIA MEIRA DE ARAÚJO

**DETECÇÃO DE ANTICORPOS E PESQUISA DE DNA DE
Leptospira spp. E *Brucella* spp. EM BOVINOS ABATIDOS
NO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-árido – UFERSA, Campus de Mossoró, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Sidnei Miyoshi Sakamoto -
UFERSA.

MOSSORÓ-RN- BRASIL
AGOSTO-2012

**Ficha catalográfica preparada pelo setor de classificação e
catalogação da Biblioteca “Orlando Teixeira” da UFERSA**

A663d Araújo, Kênia Suênia Meira de.

**Detecção de anticorpos e pesquisa de DNA de *Leptospira*
spp. e *Brucella* spp. em bovinos abatidos no estado do Rio
Grande do Norte. / Kênia Suênia Meira de Araújo. --
Mossoró, 2012.**

84 f.: il.

Dissertação (Pós-Graduação em Ciência Animal) -
Universidade Federal Rural do Semi-Árido.
Orientador: Dr: Sidnei Miyoshi Sakamoto.

1. Brucella SPP. 2. Doenças infecciosas. 3. Epidídimo. 4.
Leptospira SPP. PCR. I.Título.

CDD: 636.089691

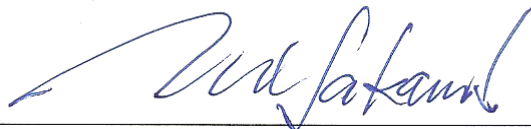
KÊNIA SUÊNIA MEIRA DE ARAÚJO

**DETECÇÃO DE ANTICORPOS E PESQUISA DE DNA DE
Leptospira spp. E *Brucella* spp. EM BOVINOS ABATIDOS
NO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-árido – UFERSA, Campus de Mossoró, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

APROVADA EM 31/08/2012.

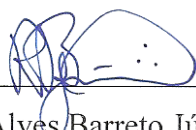
BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Sidnei Miyoshi Sakamoto (UFERSA)
Presidente



Prof. Dr. Sérgio Santos de Azevedo (UFCG)
Primeiro Conselheiro



Prof. Dr. Raimundo Alves Barreto Júnior (UFERSA)
Segundo Conselheiro

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

KÊNIA SUÊNIA MEIRA DE ARAÚJO – Nascida no município de Natal – RN, no dia 14 de outubro de 1980, filha de Marize Barbosa Silva de Araújo e Crizaldo Meira de Araújo, concluiu o ensino fundamental e médio na Escola Doméstica de Natal, em Natal-RN. Em 1998, foi aprovada no curso de Medicina Veterinária da então Escola Superior de Agricultura de Mossoró – ESAM, hoje Universidade Federal Rural do Semi-árido – UFERSA. Durante a Graduação foi bolsista de iniciação científica na área de economia e extensão rural e desenvolveu a atividade de monitoria da disciplina de técnica cirúrgica, concluindo a graduação no ano de 2002. Em 2010 foi aprovada na seleção de mestrado em ciência animal da UFERSA, com foco na pesquisa na área de sanidade animal. Profissionalmente atua como Médica Veterinária do Instituto de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado do Rio Grande do Norte – EMATER - RN, desde o ano de 2006.

*Aos meus filhos Natália e Luiz
Henrique por me apresentarem o pleno
significado da palavra amor, me
permitindo senti-lo a cada sorriso.*

DEDICO

*"Para realizarmos grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também sonhar;
não apenas planejar, mas também acreditar."*

Anatole France

AGRADECIMENTOS

A Deus por está comigo em todos os momentos e por me dar forças para desempenhar o papel de estudante, extensionista, esposa e mãe durante todo o mestrado.

Ao meu orientador Sidnei Miyoshi Sakamoto por todo o esforço, pela paciência e por ter acreditado em mim desde o primeiro momento.

Ao professor Dr. Jean Berg Alves da Silva pela amizade e por sempre ter palavras de incentivo.

Ao professor Dr. Marcos Bryan Heinemann pelo profissional e ser humano extraordinário que mostrou ser, sempre empenhado em ajudar. Não poderia de deixar registrado o meu muito obrigada.

Ao professor Dr. Andrey Pereira Lage, pela orientação na condução do trabalho no laboratório de bacteriologia aplicada da UFMG e pela preocupação em que o trabalho desse certo, me orientando com muito respeito e dedicação.

Aos professores Dr. Raimundo Alves Barreto Júnior e Dr. Sérgio Santos Azevedo, pela valiosa contribuição em minha banca de dissertação..

Ao meu esposo Carlos Henrique de Souza pelo apoio, carinho e por ser um dos meus maiores incentivadores, serei sempre grata.

A minha mãe Marize Barbosa Silva de Araújo, pelo amor e disponibilidade para ajudar na educação dos meus filhos. Sempre presente, foi uma das principais responsáveis para que eu pudesse concluir este trabalho.

À minha família em especial aos meus irmãos Klevisson Raniere, Kildere Rennie e Kris Suenir e também a Sheyenne e Sidinho, por sempre acreditarem e torcerem por mim.

A todos os colegas que estiveram comigo nesta batalha diária, em especial a Adriene, Ednaidy, Gyslaine, Isabella, Leíse, Manuella, Mariana, Patrícia, Rebeca, Rejane, Sávio, Talyta e Wanessa pela convivência sempre agradável.

A minha amiga Maria Rociene, pela simplicidade, coragem e dedicação em tudo o que faz. Sempre com palavras de conforto, foi meu ombro amigo nesta minha dura caminhada. Mesmo de longe estarei sempre torcendo e aplaudindo o seu trabalho. Muito obrigada.

A minha amiga-irmã Sthenia Santos Albano Amora pela atenção e amizade desde os tempos de graduação.

A todos os colegas de EMATER especialmente a Evilásio, Samuel, Medeiros, Raquel, Cidalina, Angela e Genildo pela compreensão nos momentos em que precisei me ausentar do trabalho e pelas palavras de força e estímulo.

Aos colegas veterinários e suas equipes que permitiram a realização das coletas nos matadouros em que eram responsáveis.

A doutoranda e colega Elaine Maria Teles Dorneles pela paciência e comprometimento com as análises laboratoriais, pela companhia e confiança a mim depositadas.

As colegas Maria Amélia Pimentel e Wanessa Souza pela ajuda indispensável durante o preparo do material. Sem vocês eu não teria conseguido.

A Universidade Federal de Minas Gerais, pela oportunidade de crescimento profissional e acadêmico.

A equipe do laboratório de Zoonoses Aplicadas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Zoonoses da universidade de São Paulo, pelo apoio na realização da SAM e do 2 -ME, em especial á Zenaide e Gisele.

DETECÇÃO DE ANTICORPOS E PESQUISA DE DNA DE *Leptospira* spp. E *Brucella* spp. EM BOVINOS ABATIDOS NO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE

ARAÚJO, Kênia Suênia Meira de. **Detecção de anticorpos e pesquisa de DNA de *Leptospira* spp. e *Brucella* spp. em bovinos abatidos no Estado do Rio Grande do Norte.** 2012. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal: Produção e Sanidade Animal) - Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2012.

RESUMO: Objetivou-se pesquisar aglutininas anti-*Leptospira* spp. e anti-*Brucella* spp. em bovinos de abatedouros públicos no Estado do Rio Grande do Norte, bem como confirmar através da PCR, a presença desses agentes nos ovários e epidídimos desses animais. Para isso, foram colhidos durante a linha normal de abate, o sangue e ovário ou epidídimo, de 306 animais no período de dezembro de 2010 a agosto de 2011. Através da Reação de Soroaglutinação Microscópica (SAM) foram detectados 189 (61,76%) animais sororeagente para *Leptospira* spp., sendo o sorovar Hardjo (24,9%) o mais predominante, seguido do Wolffi, Butembo, Icterhaemorrhagiae e Hebdomadis que contribuíram com frequências que variaram de 14,8% a 2,6%. Os sorovares Australis, Pomona, Grippotyphosa, Patoc, Canícola, Autumnalis e Sentot foram menos frequentes. Em análise em separado, o sorovar Hadjo apresentou maior ocorrência no período seco do que no chuvoso ($p=0,031$). Para a brucelose os animais foram triados através da prova do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e confirmados pela prova do 2-mercaptoetanol (2-ME). Três animais foram positivos ao AAT, desses apenas um reagiu positivamente ao 2-ME. A PCR foi utilizada para detecção do DNA bacteriano nas amostras de ovário e epidídimo. Nenhuma amostra foi positiva na PCR para detecção de DNA da *Brucella* spp. e *Leptospira* spp. Diante do exposto conclui-se que a infecção por *Leptospira* spp. em bovinos ocorre no semiárido do Rio Grande do Norte com maior frequência para o sorovar Hardjo durante o período seco do ano. A brucelose foi detectada, mas com baixa frequência. Através da PCR não foi detectado DNA de *Leptospira* spp. e *Brucella* spp. nos ovários e epidídimos dos animais.

Palavras chaves: *Brucella* spp., Doenças infecciosas, Epidídimo, *Leptospira* spp., ovário, e PCR

DETECTION OF ANTIBODY AND SEARCH OF *Leptospira* spp. AND *Brucella* spp. IN CATTLE SLAUGHTERED IN STATE OF RIO GRANDE DO NORTE

ARAÚJO, Kênia Suênia Meira de. Detection of antibody and search of *Leptospira* spp. and *Brucella* spp. in cattle slaughtered in state of Rio Grande do Norte. 2012. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal: Produção e Sanidade Animal) - Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2012.

ABSTRACT: This study was aimed at researching anti-*Leptospira* spp. and anti-*Brucella* spp. agglutinins in cattle slaughtered in public slaughterhouses in the State of Rio Grande do Norte, as well as confirm the presence of these agents through PCR in the ovaries and epididymides of the slaughtered animals. For such purpose, serum, and ovary or epididymides were collected from cattle at the public slaughterhouses of that state. Sampling was performed during normal slaughter line, without any interference as the order, sex, age, or origin of the slaughtered animals. The screening of animal reagent to leptospirosis was made through the Microscopic Agglutination Test (MAT). To search for brucellosis, animals were screened by the Buffered Acidified Antigen test (BAA) and as a confirmatory test 2-mercaptoethanol (2-ME) was used. To detect bacterial DNA in samples of ovary and epididymides the Polymerase Chain Reaction (PCR) was used. Of all the 306 animals evaluated, 189 (61.76%) were positive for the MAT, where the predominant serovar was Hardjo (24.9%). The second most frequent serovar was Wolffi (14.8%), followed by Butembo, Icterhaemorrhagiae, and Hebdomadis who contributed with frequencies ranging from 6.9% to 2.6%. Lower frequencies were found for the serovars Australis (1.6%), Pomona (1.1%), Grippotyphosa (1.1%) and Patoc (1.1%). Canicola, Autumnalis, and Sentot had frequencies lower than 1%. Three animals were positive for the BAA test, however only one of these reacted positively to 2-ME. Not one of the samples was positive for *Brucella* spp. and *Leptospira* spp. DNA through the PCR technique. Given the above mentioned data it was concluded that the *Leptospira* spp. infection in cattle in the semiarid region of Rio Grande do Norte occurs at higher frequency with the serovar Hardjo during the dry season of the year. The *Brucella* spp. infection is present but has very low frequency, and no DNA from *Leptospira* spp. and *Brucella* spp. was detected in the ovary and epididymis samples of the cattle examined.

Key words: Infectious diseases, *Leptospira* spp., *Brucella* spp., Ovary, Epididymis, and PCR.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

®	Marca Registrada
µL	Microlitro
µM	Micromol
2-Me	Teste do 2- mercaptoetanol
AAT	Teste do Antígeno Acidificado Tamponado
dNTP	Desoxirribonucleotídeos
FAO	Food and Agriculture Organization of the The United Nations
fg	Fentograma
g	Veze a gravidade
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
Mm	Milimolar
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
pb	Pares de Base
PBS	Tampão salino fosfato
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
pg	Picograma
PNCEBT	Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose
RN	Estado do Rio Grande do Norte
rpm	Rotação por minuto
SAT	Soroaglutinação em tubos
U/µL	Unidades por microlitro
UFMG	UFMG- Universidade Federal de Minas Gerais
USP	USP - Universidade de São Paulo

LISTA DE QUADROS

Capítulo 1:

Quadro 1- Prevalência da brucelose bovina em animais e propriedades infectadas em 16 estados brasileiros.....	24
Quadro 2- Espécies de <i>Brucella</i> , biovars, hospedeiros preferenciais e patogenicidade para o ser humano.....	25

Capítulo 2:

Quadro 1- Sequência de bases que compõem os primers selecionados para a reação em cadeia da polimerase para amplificação de DNA de <i>Leptospira</i> spp., <i>Brucella</i> sp. e GAPDH.	49
Quadro 2- Frequência relativa por sorovar nas 189 amostras positivas para <i>Leptospira</i> spp. para o teste de soroaglutinação microscópica dos bovinos provenientes de três abatedouros públicos do Estado do Rio Grande do Norte.....	52
Quadro 3- Distribuição de acordo com a faixa etária, dos bovinos positivos e negativos para <i>Leptospira</i> spp., provenientes dos abatedouros públicos do estado do Rio Grande do Norte, distribuídos por faixa etária.	53
Quadro 4- Distribuição de acordo com a categoria (idade em meses) e do título de anticorpos dos animais avaliados apresentados na prova de soroaglutinação microscópica, em bovinos abatidos em abatedouros públicos do Estado do Rio Grande do Norte.	54
Quadro 5- Prevalência dos sorovares Hardjo, Wolffi, Butembo, Icterohaemorrhagiae, Hebdomadis, Australis, Pomona, Grippotyphosa, Patoc, Canicola, Autumnalis e Sentot de acordo com os títulos apresentados no teste de SAM.	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Porcentagem de bovinos soro reagentes para <i>Leptospira</i> sp, provenientes dos abatedouros públicos do estado do Rio Grande do Norte, distribuídos pelo sexo.	53
Figura 2- Bovinos abatidos em matadouros públicos no Rio Grande do Norte, no período de dezembro/2010 a agosto/2011. Classificados por sexo e faixa etária.....	55
Figura 3- Prevalência dos sorovares(exceto Hardjo) de bovinos abatidos em abatedouros públicos do Estado do Rio Grande do Norte, nos dois períodos estudados (seco e chuva).....	55
Figura 4- Prevalência apenas para o sorovar Hardjo, nos dois períodos estudados (seca e chuva), de bovinos abatidos em matadouros públicos do Estado do Rio Grande do Norte.....	55
Figura 5- Gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio, com amplificação de 331 de DNA de <i>Leptospira</i> sorovar Hardjobovis, no teste de sensibilidade analítica.....	56
Figura 6- Gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio, com amplificação de 223 pb, para <i>Brucella abortus</i> , biovar 1 (544) no teste de sensibilidade analítica, para as amostras de tecido contaminado e de cultura pura.	57
Figura 7- Gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídeo, mostrando o resultado da amplificação da PCR para <i>Leptospira</i> spp., <i>Brucella</i> sp. e GAPDH em amostras de ovários e epidídimos de bovinos de abatedouros públicos do Estado do Rio Grande do Norte.....	57

SUMÁRIO

1. CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	16
1.1 INTRODUÇÃO.....	16
1.2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
1.2.1 Leptospirose.....	18
1.2.1.1 A doença nos bovinos.....	18
1.2.1.2 Epidemiologia.....	18
1.2.1.3 A bactéria.....	19
1.2.1.4 Patogenia.....	20
1.2.1.5 Diagnóstico.....	21
1.2.1.6 Tratamento e Controle.....	22
1.2.2 Brucelose.....	22
1.2.2.1 A doença nos bovinos.....	22
1.2.2.2 Epidemiologia.....	23
1.2.2.3 A Bactéria.....	24
1.2.2.4 Patogenia.....	26
1.2.2.5 Diagnóstico.....	27
1.2.2.6 Controle	29
1.3 OBJETIVOS.....	30
1.3.1 Geral	30
1.3.2 Específicos.....	30
1.4 REFERÊNCIAS	31
 2. CAPÍTULO 2 - PESQUISA DE <i>Leptospira</i> spp E <i>Brucella</i> sp EM OVÁRIOS E EPIDÍDIMOS DE BOVINOS EM ABATEDOUROS PÚBLICOS NO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE.....	 42
2.1 RESUMO	42
2.2 INTRODUÇÃO	43
2.3 MATERIAL E MÉTODOS	44
2.3.1 Abatedouro.....	44
2.3.2 Animais.....	44
2.3.3 Coleta do material.....	45
2.3.4 Provas sorológicas.....	45
2.3.4.1 Soro aglutinação microscópica.....	45

2.3.4.1.1 Triagem	46
2.3.4.1.2 Titulação.....	46
2.3.4.1.3 Leitura e interpretação.....	46
2.3.4.2 AAT e 2-ME.....	47
2.3.5 Preparação das amostras de tecido para a extração de DNA.....	47
2.3.6 Extração do DNA.....	47
2.3.7 Teste de sensibilidade analítica.....	48
2.3.8 Amplificação do DNA bacteriano.....	48
2.3.8.1 Oligonucleotídeos iniciadores.....	48
2.3.8.2 Protocolo e condição de amplificação	49
2.3.8.2.1 GAPDH.....	49
2.3.8.2.2 <i>Leptospira</i> spp.	50
2.3.8.2.3 <i>Brucella</i> spp.	50
2.3.8.3 Análise do produto amplificado	51
2.3.9 Análise Estatística.....	51
2.4 RESULTADOS	51
2.4.1 SAM	51
2.4.2 AAT e 2-ME.....	56
2.4.3 Teste de Sensibilidade Analítica	56
2.4.3.1 <i>Leptospira</i> spp.....	56
2.4.3.2. <i>Brucella</i> spp.	57
2.4.4 PCR	57
2.5 DISCUSSÃO.....	58
2.6 CONCLUSÕES.....	61
2.7 REFERÊNCIAS.....	62
ANEXOS	68
ANEXO I – CARTA DE SUBMISSÃO DO ARTIGO “” À REVISTA PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA.....	69
ANEXO II – ARTIGO PESQUISA DE <i>Leptospira</i> spp. E <i>Brucella</i> spp. EM OVÁRIOS E EPIDÍDIMOS DE BOVINOS EM ABATEDOUROS PÚBLICOS NO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE	70
ANEXO III – PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO.....	83

1. CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta o segundo maior rebanho bovino do mundo com mais de 209,541 milhões de cabeças, sendo um grande exportador de carne bovina (IBGE, 2010) e é o quarto maior produtor mundial de leite chegando a uma produção de mais de 31,6 bilhões de litros, superado apenas pelos EUA, Índia e China (FAO, 2010). Apesar disso, os níveis de produção e produtividade nacional, dos rebanhos de corte e leite, ainda são muito baixos, sobretudo na região do semiárido nordestino. Isto pode ser atribuído desde a simples erros de manejo nutricional ou reprodutivo, ou até por graves problemas sanitários. Nos animais de produção os problemas são multifatoriais (JUNQUEIRA et al. 2006), mas destaca-se a importância da brucelose e leptospirose (MINEIRO et al., 2007; POESTER et al. 2009).

A brucelose e leptospirose são causadas, respectivamente, pela infecção de bactérias Gram-negativas *Brucella* spp. e *Leptospira* spp. Nos bovinos estes agentes causam principalmente transtornos reprodutivos, especialmente o abortamento, nascimento de bezerros fracos e queda na produção de leite, levando a consideráveis perdas econômicas (POESTER et al., 2009; NAVES et al., 2012). Além disso, possuem potencial zoonótico, acometendo principalmente veterinários, laboratoristas, trabalhadores rurais e de abatedouros (BARBANTE, 2010; GONÇALVES et al., 2010; GODFROID et al., 2011).

A leptospirose está relacionada às condições ambientais e socioeconômicas, e a infecção ocorre tipicamente pela exposição de membranas mucosas à bactéria, que é eliminada pela urina de animais portadores renais e que encontram condições favoráveis para sua sobrevivência (temperatura, pH e umidade), geralmente resultando no aparecimento da doença (GROOMS, 2006).

No Brasil, segundo o último boletim técnico do Ministério da Saúde (2010), no período de 2001 a 2008, foram confirmados 27.330 casos de leptospirose em humanos, atingindo uma letalidade de 11,1% para o mesmo período, evidenciando sua importância na saúde pública. Diversos trabalhos com estudo da prevalência da leptospirose em bovinos já foram realizados no Brasil e mostraram que a leptospirose é

cosmopolita e apresenta taxas variáveis (ROLIM, 2010).

A brucelose ocorre pelo contato do agente com qualquer mucosa, principalmente a oral. Animais infectados liberam grande quantidade da bactéria durante o aborto e parto, eliminando o agente através das secreções uterinas por até 30 dias, fazendo desses materiais a principal via de eliminação para animais susceptíveis (LAGE et al., 2008). Os seres humanos tornam-se vulneráveis à medida que mantêm contato com esses materiais ou por manter certos hábitos alimentares, como o consumo de leite cru ou e seus derivados não pasteurizados (ROLIM, 2010).

Estas doenças estão intimamente ligadas às falhas reprodutivas tanto no macho como na fêmea da espécie bovina. Trabalhos já retrataram a importância da transmissão desses patógenos através do sêmen de animais infectados. A *Leptospira* spp. pode está associada a problemas de infertilidade, sendo encontrada no trato genital de touros com a forma subclínica da doença e desse modo eliminar a bactéria pelo sêmen (HEINEMANN et al., 1999, GIVENS; MARLEY, 2008).

A *Brucella abortus* também pode se localizar no trato reprodutivo de touros causando orquite, epididimite e até mesmo infertilidade. Além disso, também é disseminada através do uso da inseminação artificial, porém na brucelose bovina, a transmissão pelo coito não possui grande importância, já que o sêmen é depositado na vagina, onde as defesas inespecíficas dificultam o processo de infecção. Na fêmea esses microrganismos se localizam preferencialmente no útero gravídico e cotilédones, provocando o abortamento (BRASIL, 2006).

Levando em consideração os prejuízos reprodutivos provocados por estas enfermidades, o seu impacto econômico e a seu potencial zoonótico, o presente trabalho teve como objetivo pesquisar aglutininas anti-*Leptospira* spp. e anti-*Brucella* spp. em bovinos oriundos de abatedouros públicos do Estado do Rio Grande do Norte, bem como detectar a presença desses agentes, nos ovários e epidídimos de animais abatidos, através da PCR.

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 LEPTOSPIROSE

1.2.1.1 A doença nos bovinos

Difundida mundialmente a leptospirose é uma doença bacteriana, sistêmica que afeta diversas espécies de animais domésticos, silvestres e os seres humanos, assumindo considerável importância como problema econômico e de saúde pública, (ADLER; MOCTEZUMA, 2010).

Nos bovinos os principais sinais clínicos incluem falhas reprodutivas como: infertilidade, abortos, natimortos, mumificação fetal e nascimento de bezerros fracos levando a uma baixa na produção de carne e leite (CASTRO, 2006; ADLER; MOCTEZUMA, 2010; SARMENTO et al., 2012), sendo o sorovar Hardjo o mais frequente em estudos de soroprevalência, nesta espécie (DEL FAVA et al., 2004; LAGE et al., 2007; CASTRO et al., 2008; VIANA et al., 2010; HASHIMOTO et al., 2012; MARTINS et al., 2012).

1.2.1.2 Epidemiologia

Apesar de está mundialmente distribuída a leptospirose tem maior ocorrência em países de clima tropical e subtropical, devido principalmente a maior sobrevivência das leptospirosas em ambientes quentes e úmidos (JOUGLARD, 2005; CASTRO, 2006).

O semiárido nordestino é caracterizado por apresentar altas temperaturas com baixos índices pluviométricos, mesmo assim, a leptospirose já foi diagnosticada no semiárido paraibano em bovinos (LAGE et al., 2007) e caprinos (HIGINO et al. 2012); na Bahia em bovinos (OLIVEIRA et al., 2010); e em caprinos (ARAÚJO NETO et al., 2010) e ovinos (AZEVEDO et al., 2004) no semiárido do Rio Grande do Norte.

Em países como o Brasil, tanto em seres humanos quanto em animais, a infecção ocorre sob a forma de surtos e estão associados a períodos de alta pluviosidade, presença de roedores e mamíferos silvestres e domésticos, bem como a águas estagnadas com altas concentrações de animais (OLIVEIRA, 2008).

Sua ocorrência está relacionada às péssimas condições de infraestrutura sanitária, reflexo da baixa condição socioeconômica. É ainda considerada doença ocupacional, pois é propensa a ocorrer principalmente em veterinários, trabalhadores de abatedouro e tratadores de animais, devido ao estreito contato com as fontes de infecção (SILVA et al., 2012).

1.2.1.3 A bactéria

A leptospirose é uma doença causada pela bactéria do gênero *Leptospira* que pertence à família *Leptospiraceae*, ordem *Spirochaetales*. Apresentam conformação helicoidal, com aproximadamente 0,1µm de diâmetro e 6-20µm de comprimento, que contém uma ou ambas as terminações das células curvadas além de dois flagelos periplasmáticos responsáveis por sua motilidade. São móveis, aeróbicas, com temperatura ótima de crescimento entre 28 – 30°C (ADLER; MOCTEZUMA, 2010; MACHRY et al., 2010). Sobrevivem em solo com pH em torno de 7,2 a 7,4 e de preferência, com grande umidade. Águas superficiais alcalinas, com pH entre 7 e 8, também favorecem a sobrevivência das leptospiros (JOUGLARD, 2005). Sua visualização é possível, em microscópio equipados com condensador de campo escuro ou com contraste de fase. Porém não há como diferenciar visualmente cada uma das espécies do gênero (HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2011).

Sua classificação pode ser fundamentada tanto em critérios sorológicos (através da afinidade antigênica) quanto em critérios genéticos. Ambas as classificações reconhecem espécies patogênicas e saprófitas, no entanto, a classificação sorológica é mais utilizada. Porém a classificação através dos critérios genéticos é uma tendência futura (LEVETT, 2001).

De acordo com a classificação sorológica o gênero *Leptospira* é dividido em duas espécies: *L. interrogans*, incluindo todas as amostras patogênicas e; *L. biflexa*, abrangendo as amostras não patogênicas, isoladas do ambiente. Essa classificação adota

critérios relacionados a reações sorológicas relativamente específicas que fornecem os sorogrupos e sorovares de leptospiros patogênicas e saprófitas (LEVETT, 2001).

Em 2007, o subcomitê de taxonomia da família *Leptospiraceae* classificou esta família em 13 espécies patogênicas: *L. alexanderi*, *L. alstonii* (genomospecies 1), *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. fainei*, *L. kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. terpstrae* (genomospecies 3), *L. weilii*, *L. wolffii*, com mais de 260 sorovares, e seis espécies saprófitas: *L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. yanagawae* (genomospecies 5), *L. kmetyi*, *L. Vanthielii* (genomospecies 4), and *L. wolbachii*, contendo mais de 60 sorovares (ADLER; MOCTEZUMA, 2010).

1.2.1.4 Patogenia

A patogenia da leptospirose ocorre a partir da penetração ativa da bactéria nas mucosas, pele lesada ou até mesmo através da pele íntegra. Neste último caso a penetração pode ocorrer em condições que favoreçam a dilatação dos poros, ou seja, quando há uma permanência em tempo prolongado em coleções de águas contaminadas pela bactéria. Após a invasão, as leptospiros se multiplicam no interstício e nos humores orgânicos, caracterizando um quadro agudo septicêmico, marcado pela leptospiremia. Os microrganismos causam lesões nas células endoteliais de revestimento celular devido sua ação mecânica neste tecido, lesando os pequenos vasos, levando a hemorragias, seguidas da formação de trombos e do bloqueio do aporte sanguíneo nas áreas atingidas (ADLER; MOCTEZUMA, 2010).

Os sinais clínicos variam de acordo com a extensão das lesões e o tipo de órgão acometido. Com o aparecimento de anticorpos circulantes a bacteremia cessa, mas leptospiros se localizam e persistem em vários órgãos, especialmente no túbulo proximal renais e do trato genital feminino. É nesta fase (imunológica) que ocorre a colonização dos túbulo renais, local imunologicamente desprotegido (ELLIS, 1984).

Animais podem tornar-se portadores assintomáticos albergando leptospiros virulentas nos túbulo renais por períodos prolongados e disseminando leptospiros infecciosas no ambiente. Animais sensíveis adquirirão a infecção por contato direto ou

indireto com a urina ou tecidos de animais infectados, sendo importantes fontes de infecção para os animais e também para o homem (ADLER; MOCTEZUMA, 2010).

1.2.1.5 Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial da leptospirose pode ser realizado por diferentes técnicas laboratoriais baseadas na detecção direta ou indireta do agente. Dentre as formas indiretas a detecção de anticorpos séricos pela reação de Soroaglutinação Microscópica (SAM), é considerada a prova de referência, conforme preconiza a Organização Mundial da Saúde. Apesar de ser uma prova sorológica que permite a determinação do sorovar envolvido, esta reação não possibilita o reconhecimento da presença das leptospiras, mas sim a resposta imunológica do hospedeiro infectado por se tratar de um modo indireto, portanto não indica se a infecção é ativa (KEE et al., 1994).

O isolamento bacteriano é um método diagnóstico que permite a identificação definitiva do sorovar infectante, porém é laborioso e possui uma baixa sensibilidade (GENOVEZ et al., 1993; SCARCELLI et al., 2004).

As leptospiras são cultivadas em meios especiais, geralmente contendo soro de coelho. Sendo os meios de cultivo EMJH (Ellinghausen, McCullough, Johnson e Harris) e o meio semissólido de fletcher, os mais utilizados para o crescimento bacteriano, para o diagnóstico direto da leptospirose. O crescimento das leptospiras é lento e as culturas devem ser mantidas por até 13 semanas antes de serem descartadas como negativas (LEVETT, 2001).

O isolamento das bactérias tem grande importância nos estudos de investigação epidemiológicas, sendo essencial para a identificação da cepa envolvida em surtos ou epidemias, ou mesmo circulante em determinada área geográfica (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

Nos últimos anos as técnicas moleculares, baseadas na detecção do DNA, como a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), vêm sendo bastante utilizada para diagnóstico em fluidos e órgãos de várias espécies animais. Mostrando ser um método,

rápido, prático e seguro no diagnóstico efetivo para a confirmação da infecção em bovinos (MINEIRO et al., 2011).

1.2.1.6 Tratamento e Controle

O controle da leptospirose nos animais domésticos depende de um correto diagnóstico, tratamento apropriado e da implantação de medidas de manejo adequada. Nos bovinos a vacinação associada ao manejo desempenha um importante papel no controle da leptospirose nas propriedades (GERRITSEN et al., 1993).

A vacinação tem se mostrado uma medida prática e eficiente no controle de focos de leptospirose, sendo recomendada a vacinação anual em rebanho fechados, e semestral em rebanhos abertos. A vacina utilizada deverá conter e ser elaborada, se possível com as sorovariedades mais prevalentes da região (OLIVEIRA, 2008).

No entanto, a vacinação por si só não elimina o estado de portador, sendo importante a associação da vacinação de todos os animais do rebanho e o uso do antibiótico nos animais positivos (GIRIO et al., 2005).

CAVAZINE et al. (2008), observou em seu trabalho, que o uso de 25mg/kg do sulfato de estreptomicina, em dose única, aumentou a eficiência reprodutiva de rebanhos com leptospirose, com 87% dos animais estudados retornando a vida reprodutiva normal.

1.2.2. BRUCELOSE

1.2.2.1. A doença nos bovinos

A brucelose bovina é uma doença infecciosa, causada pela *Brucella abortus*, e que se manifesta principalmente por problemas reprodutivos como abortos no terço final da gestação e nascimento de bezerros fracos, acarretando em grandes perdas econômicas (BRASIL, 2006). Estima-se que a diminuição da produção de carne e leite

seja da ordem de 25% e que o decréscimo da produção de bezerros seja de 15% (BERNUÉS et. al, 1997).

A brucelose é também uma zoonose e está distribuída em todo o mundo, concentrando-se principalmente nos países em desenvolvimento. Pesquisas mostram que a doença ocorre endemicamente em todo o território nacional (GONÇALVES et al., 2009a; SIKUSAWA et al., 2009; DIAS et al., 2009a; SILVA et al., 2009).

A brucelose nos rebanhos leva à queda na produção animal e torna o produto da pecuária brasileira vulnerável as barreiras sanitárias e tarifárias, diminuindo sua competitividade no mercado internacional (LUCAS, 2006). Além disso, as propriedades onde a doença está presente, o valor comercial de seus animais fica depreciado e as regiões onde a doença é endêmica encontram-se em posição desvantajosa na disputa de novos mercados (BRASIL, 2006).

1.2.2.2. Epidemiologia

A brucelose bovina no Brasil tem sido diagnosticada em todos os estados do país. Porém, existem diferenças na prevalência da infecção por *B. abortus* entre os estados. Em estudo sorológico realizado pelo Ministério da Agricultura em 1975, foi observada prevalência de 4,0% na região Sul, 7,5% na região Sudeste, 6,8% na região Centro-Oeste, 2,0% na região Nordeste e 4,1% na região Norte (POESTER et al., 2005; LAGE et. al, 2008).

No período de 2001 a 2004, inquéritos soroepidemiológicos realizados em 15 estados brasileiros (quadro 1) mostraram que a doença está disseminada em todas as áreas e que a situação é heterogênea tanto entre os estados como dentro das regiões de um mesmo estado (LAGE et al., 2008; MINHARRO, 2009).

Quadro 1- Prevalência da brucelose bovina em animais e propriedades infectadas em 16 estados brasileiros.

Estado	Prevalência/ animal infectado	Prevalência/ propriedade infectada (foco)	Referências
Santa Catarina	0,06%	0,32%	(SIKUSAWA et al., 2009)
Distrito Federal	0,16%	2,5%	(GONÇALVES; RIBEIRO; et al., 2009b)
Bahia	0,66%	4,2%	(ALVES et al., 2009)
Rio Grande do Sul	1,0%	2,1%	(MARVULO et al., 2009)
Minas Gerais	1,1%	6,0%	(GONÇALVES; DELPHINO; et al., 2009a)
São Paulo	3,8%	9,7%	(DIAS; GONÇALVES; et al., 2009)b
Paraná	1,7%	4,0%	(DIAS; MÜLLER; et al., 2009)a
Espirito Santo	3,5%	9,0%	(AZEVEDO et al., 2009)
Sergipe	3,4%	12,6%	(SILVA et al., 2009)
Goiás	3,0%	17,5%	(ROCHA et al., 2009)
Rio de Janeiro	4,1%	15,4%	(KLEIN-GUNNEWIEK et al., 2009)
Tocantins	4,4%	21,2%	(OGATA et al., 2009)
Rondônia	6,2%	35,2%	(VILLAR et al., 2009)
Mato Grosso	10,2%	41,2%	(NEGREIROS et al., 2009)
Mato Grosso do Sul	12,6% - Pantanal 33,1% - Planalto	41,5%	(CHATE et al., 2009)

1.2.2.3. A bactéria

São descritos dentro do gênero *Brucella* seis espécies independentes, cada uma com seu hospedeiro preferencial: *Brucella abortus* (Bovinos e Bubalinos), *Brucella melitensis* (caprinos e ovinos), *Brucella suis* (suínos), *Brucella ovis* (ovinos), *Brucella canis* (cães) e *Brucella neotomae* (rato do deserto). Sendo que as três principais espécies, ou espécies clássicas, são subdivididas em biovariedades ou biovars (BRASIL, 2006). Mais recentemente foram descobertas outras espécies conforme descritos no quadro 2.

Quadro 2- Espécies de *Brucella*, biovars, hospedeiros preferenciais e patogenicidade para o ser humano.

Espécie <i>Brucella</i>	Biovars	Hospedeiro Preferencial	Patogenicidade para humanos
<i>B. melitensis</i>	1,2 e 3	Ovinos e caprinos	Alta
<i>B. abortus</i>	1, 2, 3, 4, 5, 6 e 9	Bovinos	Alta
<i>B. suis</i>	1, 2 e 3	Porcos	Alta
	2	Javali, Lebre	Não ^a
	4	Renas	Alta
	5	Roedores	Não
<i>B. neotomae</i>	-	Rato do deserto	Não
<i>B. ovis</i>	-	Ovinos	Não
<i>B. canis</i>	-	Cães	Moderada
<i>B. ceti</i>	-	Cetáceos	Desconhecida ^b
<i>B. pinnipedialis</i>	-	Pinípedes	Desconhecida ^b
<i>B. microti</i>	-	Raposa e ratazana	Desconhecida
<i>B. inopinata</i>	-	Desconhecido	Alta

^a Um caso de infecção por *B. suis* biovar 2 em um caçador imuno-deprimido descrito na França.

^b Contaminação de um humano em laboratório descrito no Reino Unido. Dois casos de infecção natural foram descritos, embora a fonte de infecção não possa ser rastreada até mamíferos marinhos.

(GODFROID et al., 2011).

As brucelas possuem a forma de cocobacilos ou bastonetes curtos, medindo 0,5 - 0,7 µm por 0,6-1,5 µm, gram-negativos. Não possuem cápsulas, são imóveis, parasitas intracelulares facultativos, aeróbios (alguns precisam de 5-10% de CO₂) para crescimento ou isolamento inicial. Possuem temperatura de crescimento ideal 37°C, mas crescem bem entre 24 - 40°C (MINHARRO, 2009).

A *Brucella* spp. também pode ser classificada de acordo com morfologia colonial em dois grupos: lisas e rugosas. Essa morfologia está associada à composição bioquímica do lipopolissacarídeo (LPS) da parede celular, e para algumas espécies possuem relação com a virulência (BRASIL, 2006).

Apesar de permanecer no ambiente a bactéria não se multiplica nele; são relativamente resistentes aos fatores ambientais, mas sua resistência diminui quando aumenta a temperatura e luz solar direta ou diminui a umidade. A pasteurização e as radiações ionizantes são métodos eficientes de destruição do microrganismo (BRASIL, 2006).

1.2.2.4 Patogenia

A bactéria geralmente entra no organismo do hospedeiro através da mucosa oral ou nasal. Após a penetração na mucosa, ocorre uma multiplicação bacteriana com consequente ação fagocitária pelos macrófagos do hospedeiro. Esse mecanismo favorece a proteção das brucelas, da ação do sistema imune, pois permite a sobrevivência dessas bactérias no interior dos macrófagos por grandes períodos, evitando dessa forma, a ação do complemento e dos anticorpos específicos (BRASIL, 2006).

Após a multiplicação no sítio de entrada, a *B. abortus* é transportada, livre ou dentro de macrófagos, para os linfonodos regionais, onde pode permanecer por meses. Se a bactéria não for destruída ou não se tornar localizada, há disseminação para vários órgãos pela via linfática ou hematógena. Sendo os locais preferenciais os linfonodos, baço, aparelho reprodutor masculino, úbere e útero (BRASIL, 2006). A grande predileção da brucela pelo testículo e útero gravídico, pode ser explicada pelo seu tropismo pelo eritritol, substância presente nestes órgãos (GIVENS; MARLEY, 2008).

A infecção do útero gestante e do feto ocorre por via hematógena. Inicialmente ocorre uma multiplicação das brucelas no trofoblasto do placentoma, infectando também as células adjacentes, levando a uma reação inflamatória da placenta. Essas lesões placentárias impedem a passagem de nutrientes e oxigênio da mãe para o feto, bem como provocam a infecção do feto, levando ao aborto (BRASIL, 2006; XAVIER et al., 2009)

Com o incremento da resposta imune celular após o primeiro aborto, ocorre redução no tamanho e número das lesões nas gestações subsequentes. Portanto, o aborto torna-se menos frequente, dando lugar a outras manifestações da doença como a retenção da placenta (BRASIL, 2006) e nascimento de bezerros pequenos e fracos (CHATE et al., 2009)

1.2.2.5. Diagnóstico

A brucelose animal pode ser diagnosticada por diferentes métodos ou pela combinação deles: o clínico (baseado nos sinais clínicos de aborto, nascimento de bezerros fracos e esterilidade de fêmeas e machos); o epidemiológico (fundamentados na história dos rebanhos); o direto (através do isolamento e identificação do agente etiológico, da reação em cadeia da polimerase – PCR, e as técnicas de imunohistoquímica) e o indireto baseado na sorologia com as diferentes técnicas pela demonstração de anticorpos específicos nos fluídos orgânicos (POESTER et al. 2005; BRASIL, 2006; MINHARRO, 2009).

O sorodiagnóstico é a principal ferramenta para o controle da brucelose em rebanhos, por permitir o monitoramento tanto da propriedade quanto de regiões. Todos os testes devem ser utilizados respeitando-se as normas técnicas estabelecidas pelos organismos internacionais, com antígenos padronizados e específicos para cada prova (RUIBAL, 2009).

No Brasil, os testes sorológicos oficiais preconizados pelo Programa Nacional De Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose - PNCEBT são: o Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), Anel em Leite, 2-Mercaptoetanol (2-ME) e Fixação de Complemento. Os dois primeiros como teste de triagem de rebanhos e os dois últimos como confirmatório (BRASIL, 2006).

O Teste de soroaglutinação com o Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) é um método indireto e baseia-se na detecção da IgG1. É preparado com o antígeno na concentração de 8%, tamponado em pH ácido (3,65) e corado com rosa de bengala (BRASIL, 2006). Esta acidificação do antígeno reduz a ação da IgM, tornando a prova seletiva para a identificação da IgG1. Este teste possui alta sensibilidade, é prático e de baixo custo, e ainda é realizado em um menor espaço de tempo (MEGID et al., 2000). Além disso, detecta com maior precocidade as infecções recentes (BRASIL, 2006).

O teste do 2- Mercaptoetanol (2-ME) é um teste confirmatório, preconizado pelo PNCEBT e indicado quando se deseja confirmar o resultado de teste de triagem. É uma prova quantitativa seletiva que detecta somente a presença da IgG, no soro, indicando a infecção crônica. Deve ser sempre utilizada em paralelo com a prova lenta em tubos. Esta prova está fundamentada no fato de anticorpos da classe IgM, com configuração pentamérica, degradarem-se em subunidades pela ação de compostos que contenham

radicais tiol, fazendo com que estas subunidades percam seu poder aglutinante. Com isso, soros com predomínios de IgM apresentam reações negativas nessa prova e reações positivas na prova lenta. A interpretação dos resultados é dada pela diferença entre os títulos dos soros sem tratamento (prova lenta), frente ao soro tratado com 2-ME (BRASIL, 2006).

O isolamento e identificação é o método de referência de diagnóstico da brucelose, porém a identificação da *B. abortus* é um processo lento, caro e de alto risco para o laboratorista, pois envolve a manipulação de placentas contaminadas, exsudatos vaginais, sêmen, tecidos de fetos abortados ou leite contaminado, if que exige a observação de normas estritas de biossegurança (POESTER et al, 2005; BRASIL, 2006; MINHARRO, 2009).

Uma alternativa ao isolamento e identificação da bactéria é a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) que é um método de identificação direto, rápido, altamente sensível e muito específico (BRICKER, 2002).

Nos últimos anos, diversos ensaios baseados na técnica de PCR foram descritos para a identificação da *Brucella* sp. Alguns utilizam como alvo, seqüências conservadas do gênero *Brucella*, como o gene do RNA ribossômico 16S ou gene que codifica a proteína bspc31, possibilitando a identificação genérica dos isolados. Estes ensaios revelaram uma alta especificidade por ser possível detectar um número bastante reduzido de bactérias na amostra, porém podem apresentar resultados falso – positivos apenas com o *Ochrobactrum anthropi*, microorganismo do gênero mais relacionado com *Brucella* spp. (VELASCO et al, 1998; POESTER et al, 2005).

A PCR já foi empregada com sucesso tanto para culturas puras como para a detecção da *Brucella* spp em várias amostras biológicas, como cotilédones, linfonodos supra-mamários e pré-escapulares, úbere e fígado (RUIBAL, 2009); sangue (VIEIRA, 2004); leite (ROMERO; LOPEZ-GOÑI, 1999); sêmen e urina (NOZAKI, 2008). A análise direta das amostras clínicas possui a vantagem do resultado ser imediato, porém requer um maior cuidado no preparo da amostra, para remover componentes inibidores da PCR.

1.2.2.6 Controle

Devido a importância da brucelose bovina, em 2001, o Brasil instituiu o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose - PNCEBT. O programa é baseado basicamente em vacinação massal de fêmeas (entre 3 a 8 meses de idade), sacrifício dos animais positivos, certificação de propriedades livres por rotinas de testes indiretos, controle do trânsito de animais e sistema de vigilância específico (BRASIL, 2006; POESTER et al., 2009).

Quanto a vacinação, o PNCEBT adotou a vacina B19 para a imunização em massa das bezerras entre três e oito meses de idade. A idade indicada para a vacinação visa não interferir na imunidade passiva (três meses) e a minimizar reações vacinais e proteger as bezerras antes de entrarem em puberdade (oito meses) (LAGE et al., 2008). A vacinação fora da faixa etária recomendada promove uma resposta sorologia que interfere nos testes sorológicos oficiais, produzindo um resultado falso-positivo. Isso ocorre por que a vacina B19 é produzida a partir de uma cepa lisa e, portanto expressa a cadeia O em seu lipopolissacarídeo. A amostra vacinal rugosa RB51 não possui o antígeno-O no lipopolissacarídeo e, deste modo não interfere no diagnóstico sorológico da brucelose (BASTOS et al., 2012). A partir de 2007 a vacina RB 51 foi então regulamentada no Brasil, sendo sua administração restrita à fêmeas que não foram vacinadas com a amostra B19 e para fêmeas adultas não reagentes aos testes sorológicos em estabelecimentos de criação com foco de brucelose (BRASIL, 2007).

Aliado ao PNCEBT, medidas adicionais como a correta desinfecção de áreas e utensílios contaminados, utilização de piquetes de parição com destinação adequada dos fetos e materiais de aborto, são iniciativas simples que ajudam a diminuir a quantidade de brucelas vivas no ambiente. Isso ajuda no aumento dos níveis de proteção da vacina, já que diminui a carga infectante e consequentemente a chance de outros animais se contaminarem com a bactéria (BRASIL, 2006; LAGE et al, 2008).

Por fim, realizar medidas educativas para promover a conscientização de todas as pessoas envolvidas (produtores, tratadores, trabalhadores de abatedouros e técnicos) para que as medidas preconizadas pelo programa sejam aplicadas de forma eficaz e com isso atingir as metas e objetivos do programa.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GERAL

Detectar animais soropositivos para leptospirose e brucelose em bovinos de abatedouros públicos do estado do Rio Grande do Norte.

1.3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Confirmar a presença da *Leptospira* spp. e *brucella* sp., em amostras de tecidos (ovários e epidídimo) colhidos de bovinos de abatedouros públicos do Estado do Rio Grande do Norte, através da técnica da Reação em cadeia da Polimerase (PCR).

1.4 REFERÊNCIAS

- ADLER, B.; MOCTEZUMA, A. de LA P. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3-4, p.287-296, 2010.
- ALVES, A. J. S.; GONÇALVES, V. S. P.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; BAHIENSE, L.; AMAKU, M.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S.; DIAS, R. A. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado da Bahia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 6-13, nov. 2009.
- ARAÚJO NETO, J. O.; ALVES, C. J. A.; AZEVEDO, S. A. de; SILVA, M. L. C. R. S.; BATISTA, C. S. A. B. Soroprevalência da leptospirose em caprinos da microrregião do Seridó Oriental, Estado do Rio Grande do Norte, Brasil, e pesquisa de fatores de risco. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 47, n. 2, p. 150-155, 2010.
- AZEVEDO, S. S.; ALVES, C. J.; ANDRADE, J. S. L.; BATISTA, C. S. A.; CLEMENTINO, I. J. ; SANTOS, F.A. Ocorrência de aglutininas anti-*Leptospira* em ovinos do estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista Brasileira Ciência Veterinária**, v.11, n.3, p.167-170, 2004.
- AZEVEDO, S. S.; FERREIRA NETO, J. S.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; GONÇALVES, V. S. P.; SOUZA, C. A.; VASCONCELLOS, S. A. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Espírito Santo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 19-26, nov. 2009.
- BARBANTE, P. Isolamento e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para *Leptospira* spp. em amostras renais e hepáticas de ovinos sorologicamente positivos e negativos para leptospirose, abatidos em frigoríficos, procedentes do Estado de São Paulo. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 129p. 2010.

BASTOS, R.; SOARES, C. O.; ELISEI, C.; MUNHOZ, A. L. R.; BEZERRA, N. L.; CAITANO, M. A. B.; ROSINHA, G. M. S. Avaliação genética das vacinas contra a brucelose bovina comercializadas no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, n.32, v.10, p. 957-962, 2012.

BERNUÉS, A.; MANRIQUE, E.; MAZA, M. T. Economic evaluation of bovine brucellosis and tuberculosis eradication programmes in a mountain area of Spain. **Preventive Veterinary Medicine**, v.30, p.137-149, 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. MAPA. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT)**. 188p, Brasília: MAPA/SDA/DAS, 2006.

BRASIL. Instrução normativa N°33 de 24 de agosto de 2007, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, DF. Diário Oficial da União, Brasília, DF. 1:6.

BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim eletrônico epidemiológico. 2010. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_eletronico_02_ano10.pdf. Acesso em: 09/07/2012.

BRICKER, B. J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. **Veterinary Microbiology**, n.90, p.435– 46. 2002.

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

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

CAVAZINE, N. C.; SALDANHA, G. B.; SILVA, A. S.; FERNANDES, M. B.; BADKE, M. R. T.; PIVETE, C. G. Eficiência reprodutiva de vacas com leptospirose após tratamento com sulfato de estreptomicina. **Revista da FZVA**, v.15, n.1, p. 152-159, 2008.

CHATE, S. C.; DIAS, R. A.; AMAKU, M.; FERREIRA, F. MORAES, G. M.; COSTA NETO, A. A., MONTEIRO, L. A. R. C.; LÔBO, J. R.; FIGUEIREDO, V. C. F.; GONÇALVES, V. S. P.; FERREIRA NETO, J. S. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Mato Grosso do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, supl. 1, p.46-55, 2009.

DEL FAVA, C.; VASCONCELLOS, S.A.; D'ANGELINO J.L.; MORAIS, Z.M.; FIGUEIREDO, L.A.; RAZOOK, A.G., CYRILLO, J.N.S.G.; OLIVEIRA J.V.; REICHERT, R.H. Coeficientes reprodutivos e soropositividade para *Leptospira* spp. em um rebanho bovino de corte no Estado de São Paulo, Brasil. **Ars Veterinaria**, v. 20, n.1, p.052-061, 2004.

DIAS, J. A.; MÜLLER, E. E.; DIAS, R. A.; FREITAS, J. C.; AMAKU, M.; FERREIRA, F.; SILVA, LÔBO, J. R.; FIGUEIREDO, V. C. F.; GONÇALVES, J. S.; FERREIRA NETO, J. S.. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 66-76, nov. 2009a.

DIAS, R. A.; GONÇALVES, V. S. P.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; LIMA, Z. M. B.; PAULIN, L. M. S.; GUNNEWIEK, M. F. K.; AMAKU, M.; FERREIRA NETO, J. S.; FERREIRA, F. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 118-125, 2009b.

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

FAO. Food and Agriculture Organization of the The United Nations. Disponível em: faostat.fao.org/site/339/default.aspx. Acesso em: 10/04/2012.

GENOVEZ, M. E.; SCARCELLI, E.; ROJAS, S.; GIORGI, W.; KANETO, C. N. Isolamentos bacterianos de fetos abortados bovinos examinados no Instituto Biológico de São Paulo, no período de 1985 a 1992. [Brazilian journal of veterinary research and animal science](#), v. 30, n. 2, p. 107-12, 1993.

GERRITSEN, M. J.; KOOPMANS, M. J.; OLYHOEK, T. Effect of streptomycin treatment on the shedding of and the serologic responses to *Leptospira interrogans* serovar Hardjo subtype Hardjobovis in experimentally infected cows. **Veterinary Microbiology**, n.38, p.129-138, 1993.

GIRIO, T. M. S.; GAGAJEVSKI, R. J. S.; MIASHYRO, S.; RODRIGUES, L. H.; SCARCELLI, E. P.; TOMA, S. B. Uso de estreptomicina na eliminação de leptospirúria em bovinos (*Bos taurus indicus*) naturalmente infectados pelo sorovar hardjo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, n.2, p.161-170, 2005.

GIVENS, A. D.; MARLEY, M.S.D. Pathogens that cause infertility of bulls or transmission via semen. **Theriogenology**, n.70, p.504–507, 2008.

GODFROID, J.; SCHOLZC, H. C., BARBIER, T.; NICOLAS, C.; WATTIAU, P.; FRETIN, D.; WHATMORE, A. M.; CLOECKAERT, A.; BLASCOH, J. M.; MORIYON, I.; SAEGERMAN, C.; MUMA, J. B.; AL DAHOU, S.; NEUBAUERN, H.; LETESSON, J-J. Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21 st century. **Preventive Veterinary Medicine** (2011). Artigo In Press.

GONÇALVES, A. T.; PAIVA, C.; MELO-MOTA, F.; VIEIRA, M. L.; CARREIRA, T.; NUNES, M. S.; MOTA-VIEIRA, L.; AHMED, A.; HARSTKEERL, R.A.; HYDE, K.; COLLARES-PEREIRA, M. First isolation of human leptospira strains, Azores, Portugal. **International Journal of Infectious Diseases**, n.14, p. 148-153, 2010.

GONÇALVES, V. S. P.; DELPHINO, M. K. V. C.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; FERREIRA NETO, J. S.; PORTO, T. P.; ALVES, C. M.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R. Situação epidemiológica da brucelose no Estado

de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, supl.1, p.35-45, 2009a.

GONÇALVES, V. S. P.; RIBEIRO, L. A. CALDAS, R. A.; FRANCISCO, P. F.C.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; FERREIRA NETO, J. S.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; BORGES, J. R. J. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Distrito Federal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 14-18, nov. 2009b.

GROOMS, D. L. Reproductive losses caused by bovine viral diarrhea virus and leptospirosis. **Theriogenology**, n.66, p.624-628, 2006.

HASHIMOTO, V. Y.; DIAS, J. A.; SPOHR, K. A. H.; SILVA, M. C. P.; ANDRADE, M. G. B.; MÜLLER, E. E.; FREITAS, J. C. Prevalência e fatores de risco associados à *Leptospira* spp. em rebanhos bovinos da região centro-sul do estado do Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, n.32, v.2, p.99-105, 2012.

HEINEMANN, M. B.; GARCIA, J. F.; NUNES, C. M.; MORAIS, Z. M.; GREGORI, F.; CORTEZ, A.; VASCONCELLOS, S. A.; VISINTIN, J. A.; RICHTZENHAIN. Detection of leptospires in bovine semen by polimerase chain reaction. **Australian Veterinary Journal**, v.77, n.1, 1999.

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, P.; DIAZ, C. A.; DALMAU, E. A.; QUINTERO, G. M. A comparison between polymerase chain reaction (PCR) and traditional techniques for the diagnosis of leptospirosis in bovines. **Journal of Microbiological Methods**, v. 84, n. 1, p. 1-7, 2011.

HIGINO, S. S. S.; ALVES, J. A.; SANTOS, C. S. A. B.; VASCONCELLOS, S. A.; SILVA, M.L.C.R.; BRASIL, A. W. L.; PIMENTA, C. L. R. M; AZEVEDO, S. S. Prevalence of leptospirosis in dairy goats in the semiarid region of Paraíba state. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.3, p.199-203, 2012.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. 2010. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=2002&id_pagina=1. Acesso em: 26/07/2012.

JOUGLARD, S. D. D. Diagnóstico de leptospirose por PCR e caracterização de isolados de *Leptospira* spp. Por sequenciamento do 16S rDNA e análise de VNTR. **Tese** (Doutorado em Biotecnologia Agrícola), Universidade de Federal de Pelotas, 81p. 2005.

JUNQUEIRA, J. R. C.; FREITAS, J. C.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Avaliação do desempenho reprodutivo de um rebanho bovino de corte naturalmente infectado com o BoHV-1, BVDV e *Leptospira* Hardjo. **Ciências agrárias**, v.27, n.3, p.471-480, 2006.

KEE, S. H.; KIM, I. S.; CHOI, M. S.; CHANG, W. H. Detection of leptospiral DNA by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 4, p. 1035-1039, 1994.

KLEIN-GUNNEWIEK, M. F. C.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; GITTI, C. B.; PEREIRA, L. A.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; GONÇALVES, V. P. S.; FERREIRA NETO, J. S. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Rio de Janeiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 77-84, 2009.

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

LAGE, A. P.; POESTER, F. P.; PAIXÃO, T. A.; SILVA, T. M. A.; XAVIER, M. N.; MINHARRO, S.; MIRANDA, K. L.; ALVES, C. M.; MOL, J. P. S.; SANTOS, R. L. Brucelose bovina: uma atualização. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, n.3, p.202-212, 2008.

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

LUCAS, A. Simulação de impacto econômico da brucelose bovina em rebanhos produtores de leite das regiões centro oeste, sudeste e sul do Brasil. **Tese** (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. 123p. 2006.

MACHRY, L.; RIBEIRO, R. L.; VITAL-BRAZIL, J. M.; BALASSIANO, I. T.; OLIVEIRA, I. C. M.; AVELAR, K. E. S.; PEREIRA, M. M.. Caracterização de cepas de referência de *Leptospira* spp. utilizando a técnica de pulsed field gel electrophoresis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.43, n.2, p. 166-169, 2010.

MARTINS, G.; PENNA, B.; LILENBAUM, W. Differences between seroreactivity to leptospirosis in dairy and beef cattle from the same herd in Rio de Janeiro, Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, p.377–378, 2012.

MARVULO, M. F. V.; FERREIRA, F.; DIAS, R. A.; AMAKU, M.; GROFF, A. C. M.; GONÇALVES, V. S. P.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; FERREIRA NETO, J. S. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 93-102, 2009.

MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; MARCOS JÚNIOR, G.; CROCCI, A. J. Avaliação das provas de soroaglutinação rápida, soroaglutinação lenta, antígeno acidificado tamponado e 2-mercaptoetanol no diagnóstico da brucelose bovina. **Brasilian Journal of Veretinary Research And Animal Science [online]**, v.37, n.5, 2000.

MINEIRO, A. L. B. B.; VIEIRA, R. J.; COSTA, E. A.; SANTOS, R. L.; GONÇALVES, L. M. F.; CARVALHO, S. M.; BOMFIM, M. R. Q.; COSTA, F. A. L. Serology, polymerase chain reaction and histopathology for leptospirosis in samples collected at slaughter from dairy cows of Parnaíba region, state of Piauí, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.10, n.31, p.859-866, 2011.

MINHARRO, S. B. Isolamento, tipificação e genotipagem de *Brucella abortus*, isoladas de bovinos no Brasil: **Tese** (Doutorado em Ciência Animal), Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, 77p. 2009.

NAVES, J. H. F. DE F.; REZENDE, L. M.; RAMOS, G. C. et al. Interference in diagnostic tests for brucellosis in cattle recently vaccinated against leptospirosis. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v. 24, n. 2, p. 283-287, 2012.

NEGREIROS, R. L.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S.; GONÇALVES, V. S. P.; SILVA, M. C. P.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; FREITAS, J.; AMAKU, M. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Mato Grosso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 56-65, 2009.

NOZAKI, C. N. Aspectos epidemiológicos, clínicos e avaliação dos métodos diagnósticos nas fases de evolução da brucelose em ovinos inoculados experimentalmente com *Brucella ovis*. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, [s.n.], 2008.

OGATA, R. A.; GONÇALVES, V. S. P.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; RODRIGUES, A. L.; AMAKU, M.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S.; DIAS, R. A. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Tocantins. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 126-134, 2009.

OLIVEIRA, F. C. S. Leptospirose bovina no Estado da Bahia, Brasil. Prevalência, sorovares predominantes, distribuição espacial e fatores de risco. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 123p. 2008.

OLIVEIRA, F. C. S.; AZEVEDO, S. S.; PINHEIRO, S. R.; BATISTA C. S. A.; MORAES, Z. M; SOUZA, G. O.; GONÇALES, A. P.; VASCONCELLOS, S. A. Fatores de risco para a leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no Estado da Bahia, Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 5, p. 398-402, 2010.

POESTER, F.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; GONÇALVES, V. S. P.; LAGE, A. P.; ROXO, E.; MOTA, P. M. P. C.; MÜLLER, E. E.; FERREIRA-NETO, J. S.; Estudos de prevalência da brucelose bovina no âmbito do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose: Introdução. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e zootecnia**. v.61, supl.1, p. 1-5, 2009.

POESTER, F.; SAMARTINO, L. E.; LAGE, A. P. Diagnóstico da brucelose bovina. **Caderno Técnico de Veterinária e Zootecnia**, n.47, p.13-29, 2005.

ROCHA, W. V.; GONÇALVES, V. S. P.; COELHO, C. G. N. F. L. BRITO, W. M. E. D. DIAS, R. A. DELPHINO, M. K. V. C.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; FERREIRA NETO, J. S.; FIGUEIREDO, V. C. F. LÔBO, J. R.; BRITO, L. A. B. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Goiás. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 27-34, 2009.

ROLIM, M. B. de Q. Pesquisa de antiorpos anti-*Leptospira* spp e anti-*Brucella abortus* em bovinos abatidos em matadouro público no estado de Pernambuco. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Federal Rural de Pernambuco. 57p. 2010.

ROMERO, C; LOPEZ-GOÑI, I. Improved method for purification of bacterial DNA from bovine milk for detection of *Brucella* spp. by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.8, p.3735-3737, 1999.

RUIBAL, M. P. V. Avaliação de diferentes protocolos de extração de DNA para detecção de *Brucella abortus* a partir de diferentes tecidos de vacas infectadas experimentalmente com a cepa 2308. **Dissertação** (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. 2009.79p.

SARMENTO, A. M. C.; AZEVEDO, S. S.; MORAIS, Z. M.; SOUZA, G. O.; OLIVEIRA, F. C. S.; GONÇALVES, A. G.; MIRAGLIA, F.; VASCONCELLOS, S. A. Use of *Leptospira* spp. strains isolated in Brazil in the microscopic agglutination test

applied to diagnosis of leptospirosis in cattle herds in eight brazilian states. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 7, p. 601-606, 2012. Acesso em: 24/10/2012.

SCARCELLI, E.; PIATTI, R. M.; CARDOSO, M. V.; MIYASHIRO, S.; CAMPOS, F.R.; TEIXEIRA, S.; CASTRO, V.; GENOVEZ, M.E. Detection of bacterial agents by isolation and identification and multiples PCR in aborted bovine fetuses. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, n.1, p. 23-27, 2004.

SIKUSAWA, S.; AMAKU, M.; DIAS, R. A. FERREIRA NETO, J. S.; MARTINS, C.; GONÇALVES, V. S. P.; FIGUEIREDO, V. C. F. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Santa Catarina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 61, p. 103-108, 2009. Acesso em: 10/7/2012.

SILVA, F. J.; CONCEIÇÃO, W. L. F.; GIRIO, F. R. J. S.; DIAS, R. A.; BORBAS, M. R.; MATHIAS, L. A. Prevalência e fatores de risco de leptospirose bovina no Estado do Maranhão. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.4, p.303-312, 2012.

SILVA, V. G. S. O.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; COSTA, E. L. S.; LÔBO, J.R.; FIGUEIREDO, V. C. F.; GONÇALVES, V. S. P.; FERREIRA NETO, J. S. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Sergipe. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 109-117, 2009.

VELASCO, J.; ROMERO, C.; LOPEZ-GONI, I.; LEIVA, J.; DIAZ, R; MORIYON, I. Evaluation of the relatedness of *Brucella* spp. and *Ochrobactrum anthropi* and description of *Ochrobactrum intermedium* sp. nov., a new species with a closer relationship to *Brucella* spp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.48, p.759-768, 1998.

VIANA, K. F.; ZANINI, M. S.; MOREIRA, E. C. Frequência de anticorpos anti-*leptospira* spp em rebanhos bovinos da bacia leiteira do Caparaó, Estado do Espírito Santo. **Archives of Veterinary Science**, v.15, n.2, p.100-106, 2010.

VIEIRA, N. R. Desenvolvimento de uma reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detecção de *Brucella* spp. em amostras de sangue de cães naturalmente infectados.

Dissertação (Mestrado em Epidemiologia experimental e Aplicada às Zoonoses), Universidade de São Paulo. 92f. 2004.

VILLAR, K. S.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; FERREIRA NETO, J. S.; BENITEZ, F.; GONÇALVES, V. S. P.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J. R.; FERREIRA, F. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Rondônia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, supl. 1, p.85-92, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control**. Malta, 2003.

XAVIER, M. N; PAIXÃO, T. A.; POESTER, F. P.; LAGE, A. P.; SANTOS, R. L. Pathological, Immunohistochemical and bacteriological study of tissues and milk of cows and fetuses experimentally infected with *Brucella abortus*. **Journal Comparative Pathology**. v. 140, p.149-157, 2009.

2. CAPÍTULO 2 – DETECÇÃO DE ANTICORPOS E PESQUISA DE DNA DE *Leptospira* spp. E *Brucella* spp. EM BOVINOS ABATIDOS NO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE

RESUMO – Objetivou-se pesquisar aglutininas anti-*Leptospira* spp. e anti-*Brucella* spp. em bovinos de abatedouros públicos no Estado do Rio Grande do Norte, bem como confirmar através da PCR, a presença desses agentes nos ovários e epidídimos desses animais. Para isso, foram colhidos durante a linha normal de abate, o sangue e ovário ou epidídimo, de 306 animais no período de dezembro de 2010 a agosto de 2011. Através da Reação de Soroaglutinação Microscópica (SAM) foram detectados 189 (61,76%) animais sororeagente para *Leptospira* spp., sendo o sorovar Hardjo (24,9%) o mais predominante, seguido do Wolffi, Butembo, Icterhaemorrhagiae e Hebdomadis que contribuíram com frequências que variaram de 14,8% a 2,6%. Os sorovares Australis, Pomona, Grippotyphosa, Patoc, Canícola, Autumnalis e Sentot foram menos frequentes. Em análise em separado, o sorovar Hadjo apresentou maior ocorrência no período seco do que no chuvoso ($p=0,031$). Para a brucelose os animais foram triados através da prova do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e confirmados pela prova do 2-mercaptoetanol (2-ME). Três animais foram positivos ao AAT, desses apenas um reagiu positivamente ao 2-ME. A PCR foi utilizada para detecção do DNA bacteriano nas amostras de ovário e epidídimo. Nenhuma amostra foi positiva na PCR para detecção de DNA da *Brucella* spp. e *Leptospira* spp. Diante do exposto conclui-se que a infecção por *Leptospira* spp. em bovinos ocorre no semiárido do Rio Grande do Norte com maior frequência para o sorovar Hardjo durante o período seco do ano. A brucelose foi detectada, mas com baixa frequência. Através da PCR não foi detectado DNA de *Leptospira* spp. e *Brucella* spp. nos ovários e epidídimos dos animais.

Palavras Chave: Doenças infecciosas, *Leptospira* spp., *Brucella* spp., ovário, epidídimo e PCR.

2.2 INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta o segundo maior rebanho bovino do mundo com mais de 209,541 milhões de cabeças, sendo um grande exportador de carne bovina (IBGE, 2010) e é o quarto maior produtor mundial de leite chegando a uma produção de mais de 31,6 bilhões de litros, superado apenas pelos EUA, Índia e China (FAO, 2010). Apesar disso, os níveis de produção e produtividade nacional, dos rebanhos de corte e leite, ainda são muito baixos, sobretudo na região do semiárido nordestino. Nos animais de produção os problemas são multifatoriais (JUNQUEIRA, et al. 2006), mas destaca-se a importância da brucelose e leptospirose (MINEIRO et al., 2007; POESTER et al. 2009).

Causadas respectivamente pela *Leptospira* spp e *Brucella abortus*, estas doenças são caracterizadas por distúrbios reprodutivos em bovinos, por acarretarem principalmente abortamentos, natimortos, nascimento de bezerros fracos e diminuição na produção de leite, levando a consideráveis perdas econômicas. Além disso, são importantes zoonoses que acometem principalmente veterinários, laboratoristas, trabalhadores rurais e de abatedouros, por ficarem mais expostos às fontes de infecção, mostrando ser uma doença com forte caráter ocupacional (GONÇALVES et al., 2010).

Tanto a brucelose quanto a leptospirose podem ser diagnosticadas através de métodos sorológicos, pela detecção de anticorpos específicos no soro, porém estes métodos podem dar resultados falsos positivos ou falsos negativos. Métodos diretos de detecção da bactéria no hospedeiro são mais objetivos. O isolamento bacteriano, considerado um método direto, é usualmente empregado, no entanto é mais difícil, demorado e perigoso (RICHTZENHAIN et al., 2002).

Com o advento da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), vários trabalhos já foram desenvolvidos usando esta técnica como método diagnóstico na detecção de *Leptospira* spp. (MÉRIEN et al., 1992; BIELANSKI et al., 1998, HEINEMANN et al., 2000; MAGAJEVSKI et al., 2005; MAGAJEVSKI et al., 2009) e *Brucella* (ROMERO; LOPEZ-GOÑI, 1999, HAMDY; AMIN, 2002) a partir de tecidos e fluidos orgânicos.

Mesmo com as técnicas disponíveis para o diagnóstico da leptospirose e brucelose, pouco se conhece sobre a real situação sanitária do rebanho bovino abatido no Estado do Rio Grande do Norte, frente a estas doenças. Além disso, a leptospirose e brucelose são importantes doenças que acometem o trato reprodutivo de touros e vacas.

Portanto, se objetivou detectar a presença de aglutininas anti-*Leptospira* spp. e anti-*Brucella* spp. em bovinos oriundos de abatedouros públicos do Estado do Rio Grande do Norte, bem como confirmar a presença desses agentes nos ovários e epidídimos dos animais abatidos, através da PCR.

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1 Abatedouros

O estudo foi realizado em abatedouros públicos municipais da região semiárida do Estado do Rio Grande do Norte. As coletas foram realizadas nos estabelecimentos que permitiram o acesso, e foi autorizada pelos responsáveis técnicos dos mesmos. Portanto, foram incluídos neste estudo, os abatedouros pertencentes aos municípios de Açu, Alto do Rodrigues e São Vicente. Os dois primeiros localizados na microrregião do Vale do Açu e o terceiro na microrregião da Serra de Santana. O clima predominante nestas áreas é o semiárido, caracterizado por longos períodos de seca, com temperaturas que chegam a ultrapassar os 26°C, chuvas escassas e irregulares, com pluviosidade abaixo de seiscentos milímetros anuais (IDEMA, 2010).

2.3.2 Animais

No período de dezembro de 2010 a setembro de 2011, foram coletados materiais de 306 bovinos, durante a linha de abate sem nenhuma distinção quanto ao sexo, idade, raça ou local de origem. Para obtenção dos dados referente a procedência, idade e sexo dos animais, dados da Guia de trânsito animal (GTA) foram anotados, quando disponibilizados.

2.3.3 Coleta do material

As colheitas de amostras foram realizadas entre dezembro de 2010 e agosto de 2011, abrangendo meses de chuva, março a junho, e os demais, classificados como meses de seca. Durante o processo da sangria, coletou-se o sangue para a obtenção do soro. A coleta foi realizada em tubo vacutainer de 10 ml, sem anticoagulante, devidamente identificado. O soro foi obtido após a retração do coágulo. O material foi centrifugado a 2.000 x g por 5 minutos, e uma alíquota do soro foi retirada para realização do teste do Antígeno Acidificado Tamponado. O restante do material foi aliquotado em microtubos de 1,5 ml, com sua respectiva identificação e mantido à -20 °C até o momento da realização do 2-Mercaptoetanol e da Soroaglutinação microscópica.

Os epidídimos e ovários foram coletados, seguindo a linha de abate. As amostras desses órgãos foram armazenadas em coletores universais estéreis, devidamente identificados e transportados em caixas isotérmicas com gelo reciclável até a chegada ao laboratório, onde foi transferido para freezer a -20 °C até o processamento.

2.3.4 Provas Sorológicas

2.3.4.1 Soroaglutinação microscópica (SAM)

O diagnóstico sorológico para infecção por *Leptospira* spp. foi realizado através do teste de soroaglutinação microscópica (SAM), seguindo a metodologia proposta por Galton (1965) e Cole (1973), no Laboratório de Zoonoses Bacteriana da Universidade de São Paulo.

O Teste foi realizado com uma coleção de culturas vivas de *Leptospira* spp. com um representante de cada sorogrupo, totalizando 25 variantes sorológicas: Australis, Bratislava, Autumnalis, Butembo, Castellonis, Bataviae, Canicola, Whitcombi, Cynopteri, Grippotyphosa, Hebdomadis, Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, Javanica,

Panama, Pomona, Pyrogenes, Hardjo (estirpes Hardjoprajitno e Hardjobovis), Wolffi, Shermani, Tarassovi, Andamana, Patoc e Sentot.

2.3.4.1.1 Triagem

Cada amostra de soro foi diluída a 1:50 em solução tamponada de Sorënsen (pH 7,4). Desta diluição 50 µL foram colocados em microplaca de poliestireno de fundo chato com 96 poços, e acrescentados 50 µL do antígeno, obtendo-se diluição inicial de 1:100. Cada amostra sorológica foi colocada frente à bateria antigênia com 25 sorovares. As microplacas foram encubadas em estufa bacteriológica a 28°C por três horas.

2.3.4.1.2 Titulação

Soros reagentes na triagem foram novamente testados para a determinação do título final de aglutininas anti-leptospiras, efetuando-se diluições seriadas em escala geométrica de razão dois em solução salina tamponada de Sorënsen (pH 7,4) e acrescidos de 50 µL do antígeno que foi detectado positivo na triagem. As microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica a 28°C por três horas.

2.3.4.1.3 Leitura e interpretação

As leituras foram realizadas em microscópio óptico de campo escuro, observando-se a formação de aglutinações. O título final foi a recíproca da maior diluição (≥ 100) que apresentou pelo menos 50% de leptospiras aglutinadas.

2.3.4.2 AAT e 2-ME

A sorologia para brucelose foi realizada através das prova do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e 2-Mercaptoetanol (2-ME), sendo o primeiro utilizado como teste de triagem e o segundo como teste confirmatório, e foram realizados segundo as orientações do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal – PNCEBT (BRASIL, 2006).

2.3.5 Preparação das amostras de tecido para a extração de DNA

No Laboratório de Bacteriologia Aplicada, da Universidade Federal de Minas Gerais foi realizado o preparo das amostras de ovário e epidídimo, de todos os animais do estudo. Após o descongelamento lento e em cabine de biossegurança classe II, os órgãos foram transferidos para placas de petri descartáveis onde foram totalmente fragmentadas com o auxílio de bisturi estéril. Em seguida, foi adicionado 50 ml de tampão fosfato salino (PBS) 1X, estéril, ao saco stomacher juntamente com o tecido fragmentado. Esse material foi colocado em aparelho homogeneizador de amostras, programado com 490 golpes/minuto, durante 10 minutos. Após a homogeneização, uma alíquota de 1ml foi transferida para microtubos de 1,5ml, livres de DNase e RNase. Essa alíquota foi centrifugada por 5 minutos à 14500 rpm. Em seguida o sobrenadante foi descartado e o material armazenado, quando se obteve um *pellet* de 25mg, à -20 °C, até o momento da extração do DNA.

2.3.6 Extração do DNA

Para a extração do DNA utilizou-se o Kit Promega ReliaPrep™ gDNA tissue Miniprep Systems® conforme recomendações do fabricante.

2.3.7 Teste de sensibilidade analítica

Após a extração, o DNA foi quantificado por espectrofotometria a 260 nm, diluído e aliquotado em concentrações decrescentes e realizou-se o teste de sensibilidade analítica para 10 e 1 ng, 100, 10 e 1 pg e 100, 10 e 1 fg/ μ L, a fim de detectar a eficiência da reação. O teste foi realizado tanto para cultura pura quanto para os tecidos (ovário e epidídimo), contaminados com as quantidades de DNA citadas anteriormente. O teste foi feito utilizando-se como amostras de referência cepa de *L. hadjobovis* e *L. icterohaemorrhagiae*, provenientes da coleção de leptospiros do Laboratório de Leptospirose da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

Para o teste de sensibilidade analítica da *Brucella* spp., utilizou-se como amostra de referência *B. abortus* (biovariedade 1, amostra 544), com as mesmas concentrações empregadas para leptospiros.

2.3.8 Amplificação do DNA bacteriano

2.3.8.1 Oligonucleotídeos iniciadores

Para amplificação de DNA de *Leptospira* spp. foram propostos os oligonucleotídeos iniciadores gênero-específicos Lep 1 e Lep 2, descritos por Mérien et al. (1992), e para *Brucella* spp., os *primers* gênero específicos, B4 e B5, descritos por Baily et al. (1992). O gene da desidrogenase gliceraldeído-3-fosfato (GAPDH) foi utilizado como controle da extração (ALVES, 2010) (Quadro 1).

Quadro 1. Sequência de bases que compõem os *primers* selecionados para a reação em cadeia pela polimerase para amplificação de DNA de *Leptospira* spp., *Brucella* spp. e GAPDH

<i>Primers</i>	Sequência	<i>Amplicon</i> (pb)	Gene
Lep 1	5' GGCGGCGCGTCTTAAACATG 3'	331	rrs (16S)
Lep 2	3' TTAGAACGAGTTACCCCCCTT 5'		<i>L.interrogans</i>
B4	5' TGGCTCGGTTGCCAATATCAA 3'	223	bcbp31,
B5	3' CGCGCTTGCCCTTCAAGGTCTG 5'		<i>Brucella</i> spp.
GAPDH (Senso)	5'ATGGTGAAGGTCGGAGTGAACG3'	109	GAPDH
GAPDH (Antisenso)	5'TGTAGTGAAGGTCAATGAAGGGGTC3'		

2.3.9.2 Protocolo e condição de amplificação

2.3.8.2.1 GAPDH

O *mix* da PCR para o GAPDH foi preparado para uma reação de 25µL, contendo: 11,00 µL de água milliQ, 2,5 µL de tampão IO 10x (Phoneutria®, Belo Horizonte, MG, Brazil), 2,5 µL de dNTP (2 mM), 2,5 µL de cada *primer*, GAPDH - F e GAPDH - R (10µM), 1,5 µL de MgCl₂ (50 mM) e 0,5µL da enzima Taq Polimerase (5 U/µL) Phoneutria ®. Para completar a reação, acrescentou-se 2,0 µL do DNA da amostra a ser analisada.

Para amplificação da reação fez-se o uso de um termociclador (Applied Biosystems), com a seguinte programação: desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguido por 40 ciclos a 94°C por 60 segundos (desnaturação); 60°C por 60 segundos (anelamento); 72°C por 60 segundos (extensão) e uma extensão final à 72°C por 10 minutos.

2.3.8.2.2 *Leptospira* spp.

Para a PCR da *Leptospira* spp. o *mix* foi preparado com 11,25 µL de água milliQ, 2,5 µL de tampão IO 10X (Phoneutria®, Belo Horizonte, MG, Brazil), 2,5 µL de dNTP (2 mM), 2,5 µL de cada *primer*, LEP 1 e LEP 2 (10µM), 1 µL de MgCl₂ (50mM) e 0,25µL da enzima Taq Polimerase (5U/µL) Phoneutria® e 2,5 µL do DNA da amostra a ser analisada, completando uma reação de 25µL.

O programa proposto para amplificação, em termociclador (Applied Biosystems) seguiu as seguintes etapas: 94°C por 3 minutos para desnaturação inicial do DNA, 30 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação do DNA), 63°C por 45 segundos para o anelamento dos “primers” e 72°C por 30 segundos (extensão do DNA), seguidos de uma etapa de extensão final à 72 °C por 10 minutos segundo Mérien et al., (1992) com modificações.

2.3.8.2.3 *Brucella* spp.

O *mix* para a PCR da *Brucella* spp. foi realizado para uma reação de 25µL, contendo: 10,00 µL de água milliQ, 2,5 µL de tampão IO 10X (Phoneutria®), 2,5 µL de dNTPs (2mM), 2,5 µL de cada *primer* B4 e B5 (10 µM), 1,5 µL de MgCl₂ (50mM) e 0,5µL da enzima Taq Polimerase (5U/ µL) (Phoneutria®). Para completar a reação, acrescentou-se 3,0 µL do DNA da amostra a ser analisada.

As etapas para amplificação da reação foram realizadas em termociclador (Applied Biosystems), com a seguinte programação: desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguido por 40 ciclos a 94°C por 60 segundos (desnaturação); 60°C por 60 segundos (anelamento); 72°C por 60 segundos (extensão) e uma extensão final à 72°C por 10 minutos.(RICHTZENHAIN et al., 2002).

2.3.8.3 Análise do produto amplificado

Os produtos da amplificação pela PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, em tampão Tris-borato-EDTA (TBE) (89mM Tris Base, 89mM ácido bórico e 2mM EDTA pH8.0) (Sigma, EUA), por 80 minutos a 100 volts, utilizando o brometo de etídeo (0,5mg/mL), como corante evidenciador do DNA. Um marcador de peso molecular 1kb plus DNA Ladder (Invitrogen, EUA) foi utilizado como parâmetro de avaliação do tamanho das bandas geradas.

Seguida a eletroforese, os géis foram observados à luz ultravioleta e fotografados. (L-PIX EX, Loccus Biotecnologia, Brasil).

2.3.9 Análise Estatística

Foram empregados testes não paramétricos (qui-quadrado e Kruskal-Wallis para amostras independentes), adotando-se o nível de significância 0,05 com auxílio do programa IBM® SPSS® Statistics versão 20.

2.4 RESULTADOS

2.4.1 SAM

O estudo foi realizado em três abatedouros do Rio Grande do Norte (Açu, Alto do Rodrigues e São Vicente) e envolveu os municípios de Açu, Angicos, Alto do Rodrigues, Carnaubais, Ipanguaçu, Janduis, Paraú, Pendências, Santana dos Matos, São Vicente, Triunfo Potiguar e Upanema, já que os animais abatidos procediam desses municípios. Todos os abatedouros e municípios que foram incluídos neste estudo apresentaram pelo menos uma amostra positiva, para um dos 25 sorovares diferentes de *Leptospira* spp. estudadas.

Dos 306 animais testados, 189 (61,8%) reagiram positivamente ao teste de soraglutinação microscópica. Destes, 118 (62,4%) foram reagentes a pelo menos um dos 25 sorovares de *Leptospira* spp. testadas enquanto 71 (37,6%) reagiram positivamente para múltiplas amostras.

Quadro 2- Frequência relativa por sorovar nas 189 amostras positivas para *Leptospira* spp. para o teste de soraglutinação microscópica dos bovinos provenientes de três abatedouros públicos do Estado do Rio Grande do Norte.

VARIANTE SOROLÓGICA	POSITIVOS	Frequência Relativa (%)*
Hardjo		
Hardjopravitno	28	14,8
Hardjobovis	19	10,1
Wolffi	28	14,8
Butembo	13	6,9
Icterohaemorrhagiae	13	6,9
Hebdomadis	5	2,6
Australis	3	1,6
Pomona	2	1,1
Grippotyphosa	2	1,1
Patoc	2	1,1
Canicola	1	0,5
Autumnalis	1	0,5
Sentot	1	0,5

*Frequência relativa obtida pela divisão do número de positivos de cada sorovar pelo total de positivos para *Leptospira* spp. (189).

O sorovar mais frequente entre os animais que reagiram para apenas um sorovar foi Hardjo que contribuiu com 24,9% dos resultados positivos, destes a estirpe Hardjopravitno apresentou 14,8% e a Hardjobovis 10,1%. O segundo sorovar mais frequente foi o Wolffi com 14,8%, seguidos por Butembo, Icterhaemorrhagiae e Hebdomadis que contribuíram com frequências que variaram de 6,9% a 2,6%. Menores frequências foram encontradas para os sorovares Australis (1,6%), Pomona (1,1%), Grippotyphosa (1,1%) e Patoc (1,1%). Canícola, Autumnalis e Sentot tiveram frequências menores do que 1% (Quadro 2).

Quanto ao sexo, 52,9% (n=162) dos animais do estudo eram fêmeas e 47,1% (n=144) machos. Dos bovinos positivos para apenas um sorovar, tanto as fêmeas quanto os machos apresentaram o sorovar Hardjo como o mais frequente. Porém não houve diferença estatística significativa entre a ocorrência de machos e fêmeas.

Em relação a faixa etária (figura 1) trabalhada (13-24, 25-36 e acima de 36 meses), observou-se que todas foram afetadas, com maior frequência para os animais mais novos (Quadro 3).

Quadro 3- Distribuição de acordo com a faixa etária, dos bovinos positivos e negativos para *Leptospira* spp., provenientes dos abatedouros públicos do estado do Rio Grande do Norte, distribuídos por faixa etária

Faixa etária (meses)	Bovinos Positivos	%	Bovinos Negativos	%	TOTAL
12 – 24	13	76,47	4	23,53	17
25 – 36	73	64,60	40	35,40	113
> 36	103	58,52	73	41,48	176
TOTAL	189		117		306

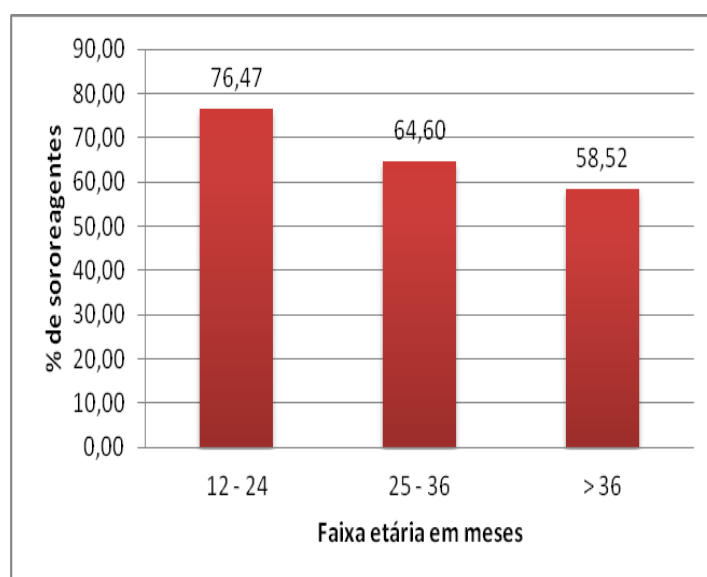


Figura 1- Porcentagem de bovinos soro reagentes para *Leptospira* spp., provenientes dos abatedouros públicos do estado do Rio Grande do Norte, distribuídos por faixa etária

Além disso, estes animais apresentaram com maior frequência títulos iguais ou menores que 1:400. Enquanto os animais de 25-35 e acima de 36 meses apresentaram mais frequentemente títulos $\geq 1:800$ (Quadro 4).

Quadro 4- Distribuição de acordo com a categoria (idade em meses) e do título de anticorpos dos animais avaliados apresentados na prova de soroglutinação microscópica, em bovinos abatidos em abatedouros públicos do Estado do Rio Grande do Norte.

INFECÇÃO/ ANIMAL POSITIVO	Idade em meses			TOTAL (%) (n=306)
	13-24 (%) (n=17)	25 – 35 (%) (n=113)	≥36 s (%) (n=176)	
LEPTOSPIROSE				
Diluição: até 1:400	11 (64,7)	51 (45,1)	73 (41,5)	135 (44,1)
Diluição: ≥1:800	2 (11,8)	22 (19,5)	30 (17,0)	54 (17,6)
Sub- total	13 (76,5)	73 (64,6)	103 (58,5)	189 (61,8)

Outro dado importante observado, foi que a frequência dos maiores títulos (≥ 1:800) foi maior nos animais sororeagentes para os sorovares Hardjo e Wolffi (Quadro 5).

Quadro 5. Prevalência dos sorovares Hardjo, Wolffi, Butembo, Icterohaemorrhagiae, Hebdomadis, Australis, Pomona, Grippotyphosa, Patoc, Canicola, Autumnalis e Sentot de acordo com os títulos apresentados no teste de SAM.

SOROVAR	TÍTULOS												TOTAL		
	100		200		400		800		1600		3200		N°	% ^a	% ^b
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%			
Hardjo															
Hardjoprajtino		0	8	6,78	9	7,63	9	7,63	0	0	2	1,69	28	9,15	23,73
Hardjobovis	4	3,39	3	2,54	6	5,08	3	2,54	3	2,54	0	0	19	6,21	16,10
Wolffi	0	0	5	4,24	9	7,63	8	6,78	1	0,85	5	4,24	28	9,15	23,73
Butembo	8	6,78	4	3,39	1	0,85	0	0	0	0	0	0	13	4,25	11,02
Icterohaemorrhagiae	10	8,47	3	2,54	0	0	0	0	0	0	0	0	13	4,25	11,02
Hebdomadis	3	2,54	0	0	2	1,69	0	0	0	0	0	0	5	1,63	4,24
Australis	2	1,69	1	0,85	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0,98	2,54
Pomona	1	0,85	1	0,85	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0,65	1,69
Grippotyphosa	0	0	0	0	1	0,85	0	0	0	0	1	0,85	2	0,65	1,69
Patoc	0	0	1	0,85	1	0,85	0	0	0	0	0	0	2	0,65	1,69
Canicola	0	0	1	0,85	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,33	0,85
Autumnalis	1	0,85	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,33	0,85
Sentot	1	0,85	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,33	0,85
Total geral	30	25,42	27	22,88	29	24,58	20	16,95	4	3,39	8	6,78	118	38,56	100

^a: em relação ao total de animais examinados (306)

^b: em relação ao total de animais sororreagentes a apenas um sorovar (118)

Entretanto, uma análise em separado da estratificação etária por sexo, mostrou predomínio de animais acima de 36 meses nas fêmeas e, nos machos, um predomínio dos animais agrupados na idade entre 25 e 36 meses ($p < 0,001$), como mostra a Figura 2.

Não houve diferença quanto à estratificação etária quando comparados o grupo dos animais infectados com os não infectados.

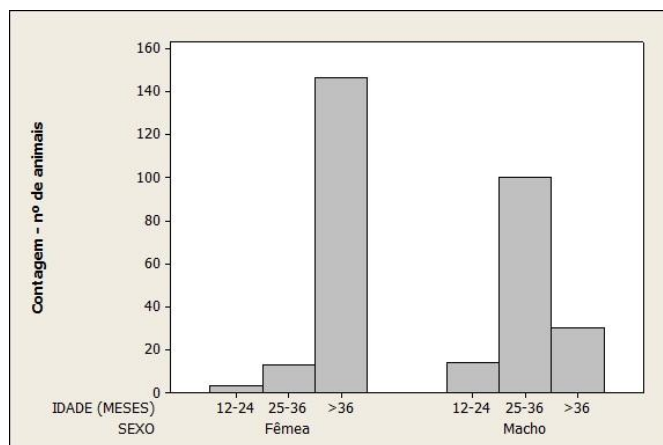


Figura 2- Bovinos abatidos em matadouros públicos no Rio Grande do Norte, no período de dezembro/2010 a agosto/2011. Classificados por sexo e faixa etária

A partir da análise dos dados foi possível observar comportamentos opostos entre o padrão de distribuição das taxas de ocorrência, nas diferentes épocas do ano (chuva e seca), quando foram analisados todos os sorovares com exceção do Hardjo e quando esta análise foi feita apenas para o Hardjo. Na primeira situação (sem Hardjo), foram verificados maiores medianas no período de chuvas ($p=0,031$) (Figura 3). Em contraposição, quando da análise isolada para o sorovar Hardjo, as taxas de ocorrência foram maiores no período seco quando comparado ao período chuvoso ($p=0,038$) (figura 4).

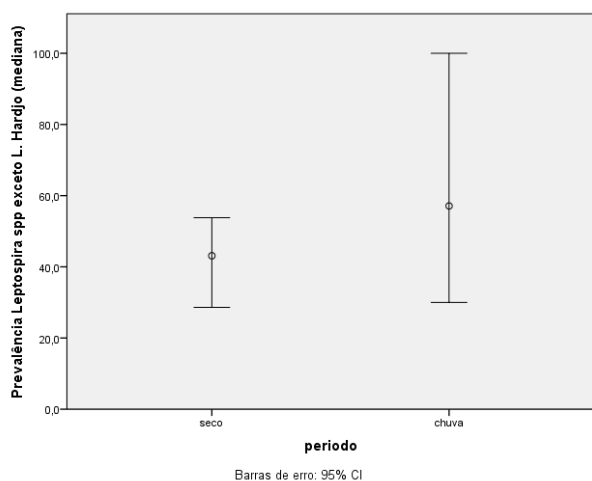


Figura 3

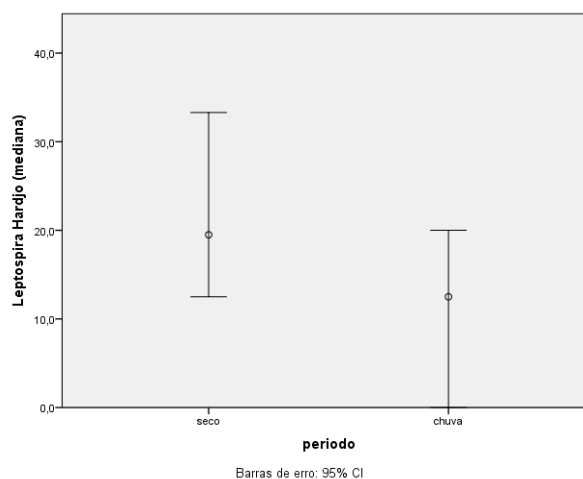


Figura 4

Figura 3- Prevalência dos sorovares (exceto Hardjo) de bovinos abatidos em abatedouros públicos do Estado do Rio Grande do Norte, nos dois períodos estudados (seco e chuva).

Figura 4- Prevalência apenas para o sorovar Hardjo, nos dois períodos estudados (seca e chuva), de bovinos abatidos em matadouros públicos do Estado do Rio Grande do Norte.

2.4.2 AAT e 2-ME

Três animais foram reagentes ao teste do AAT, porém apenas um (0,32%) apresentou reação positiva no teste confirmatório do 2- ME (SAL=200 e 2-ME=100). Este animal foi abatido no abatedouro do município de Açu, mas era oriundo do município de Parau-RN. Tratava-se de um macho com mais de 36 meses de idade.

2.4.3 Teste de Sensibilidade Analítica

2.4.3.1 *Leptospira* spp.

O teste mostrou uma sensibilidade analítica até 1pg/μL, tanto para cultura de *Leptospira* sorovar hardjobovis (Fig.5, canaletas 2 a 9), como para a tecido contaminado com a cultura (Fig. 5, canaletas 10 a 17).



Figura 5. Gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio, com amplificação do DNA de *Leptospira* sorovar Hardjobovis, no teste de sensibilidade analítica. Canaletas: 1 e 18 (marcador de peso molecular 1Kb Plus -Invitrogen®), 2-3 (10 e 1 ng/μL), 4-6 (100, 10 e 1 pg/ μL), 7-9 (100, 10 e 1 fg/ μL), 10-11(10 e 1 ng), 12-14 (100, 10 e 1 pg), 15-17 (100, 10 e 1 fg).

2.4.3.2. *Brucella* spp.

O teste mostrou uma sensibilidade analítica de até 10ng/μL para a cultura mais o tecido (Fig.6, canaletas 1 a 8), e de 100pg/μL para a cultura pura (Fig.6, canaletas 9 a 16).

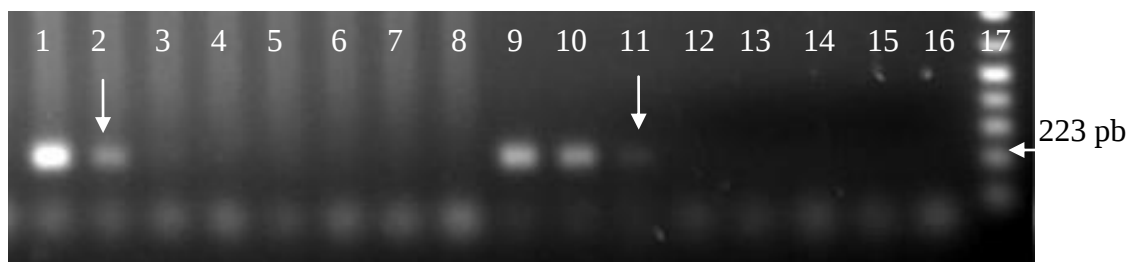


Figura 6. Gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio, com amplificação de 223 pb, para *Brucella abortus*, biovar 1 (544) no teste de sensibilidade analítica, para as amostras de tecido contaminado e de cultura pura. Canaletas: 1-2 (10 e 1 ng), 3-5 (100, 10 e 1 pg/ μL), 6-8 (100, 10 e 1 fg/μL), 9 -10(10 e 1 ng/ μL), 11-13 (100, 10 e 1 pg), 14-16 (100, 10 e 1 fg), 17 (marcador de peso molecular 1Kb Plus -Invitrogen®).

2.4.4 PCR

Não foi detectada a presença de DNA de *Leptospira* spp. e *Brucella* spp. nas amostras de ovários e epidídimos dos animais do estudo. Todas as amostras amplificaram para o GAPDH, mostrando que havia DNA bovino nas amostras analisadas e que a extração foi eficiente (figura 7).

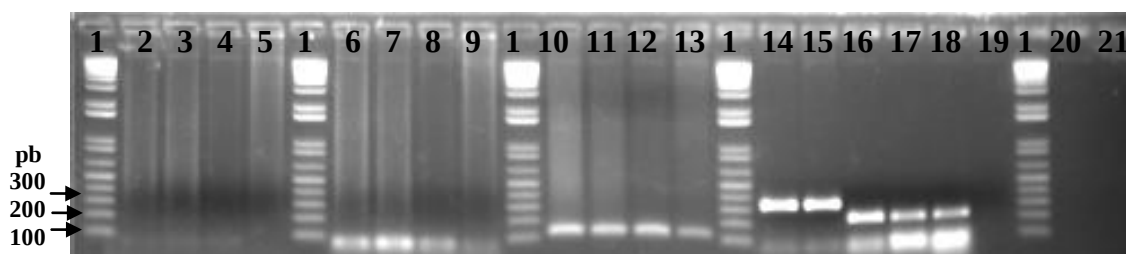


Figura 7. Gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídeo (0,5 mg/mL), mostrando o resultado da amplificação da PCR para *Leptospira* spp., *Brucella* sp. e GAPDH em amostras de ovários e epidídimos de bovinos de abatedouros públicos de do Estado do Rio Grande do Norte. PCR para *Leptospira* spp (canaletas 2-5) nas amostras de ovário (canaletas 2-3) e epidídimo (canaletas 4-5); Para *Brucella* sp (canaletas 6-9) em ovário (Canaletas 6-7) e epidídimo (Canaletas 8-9); para o GAPDH (canaletas 10-13) em

amostras de ovário (canaletas 10-11) e epidídimo (canaletas 12-13). Controle positivo *Leptospira* sorovares hardjobovis (canaleta 14) e Icterohaemorrhagiae (canaleta 15). Controles positivos *Brucella abortus* amostra de referência 870, Tulya e 544 (canaletas 16,17 e 18 respectivamente). Controles negativos (canaletas 19, 20 e 21). Canaleta 1 - Marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen, EUA).

2.5 DISCUSSÃO

Investigação de aglutininas anti-*Leptospira* spp. e anti-*Brucella* spp. em animais de abatedouros não é o mais apropriado para determinar a prevalência em uma certa região, pois há limitações quanto ao número e as diferentes origens dos animais. Entretanto, ela permite obter uma noção geral da sua ocorrência e pode sugerir quais agentes possuem maior importância na região de origem dos animais.

Considerou-se o sorovar de maior título como o sorovar mais provável e, os animais com os títulos mais elevados idênticos para dois ou mais sorovares foram classificados como animais soropositivos sem a possibilidade de identificação do sorovar. O sorovar mais provável mais prevalente neste estudo foi o Hardjo (genotipos Hardjobovis e Hardjopravito), que ocorreu em 24,9% dos animais soro reagentes. O predomínio deste sorovar está de acordo com vários estudos com bovinos desenvolvidos em diferentes regiões do Brasil: na região do Parnaíba no Piauí (MINEIRO et al., 2011), na Bahia (OLIVEIRA et al., 2010), em São Paulo (CASTRO et al., 2008) e no Rio Grande do Sul (MESQUITA et al., 2010). Favero et al. (2001) encontraram o sorovar Hardjo como o mais prevalente em 21 estados brasileiros, no soro de 31.325 bovinos amostrados. Todavia, resultados diferentes foram encontrados por Juliano et al. (2000) que obtiveram o sorovar Wolffi como mais frequente, com o sorovar Hardjo aparecendo com apenas 5,20% dos animais positivos.

O segundo sorovar mais frequente encontrado foi o Wolffi (14,8%) que também se destaca pela sua alta frequência em bovinos no Brasil, onde as reações cruzadas entre Hardjo e Wolffi são muito comuns devido às relações antigênicas existentes entre ambos, e por isso são classificados no mesmo sorogruppo, o Sejroe (COSTA et al. 1998).

Não houve diferença estatística significativa entre a ocorrência de machos e fêmeas. Com relação as faixas etárias estudadas (12-24, 24-36 e >36 meses) foi possível observar que todas foram acometidas, mostrando que a leptospirose se apresenta de

forma endêmica em todas as faixas etárias. Os bovinos com idade entre 12-24 meses apresentaram maior porcentagem de animais reagentes com 76,47%. Este resultado mostra que os animais estão se infectando ainda quando jovens, tornando-se prováveis portadores renais, eliminando as bactérias e infectando outros animais susceptíveis. Estes dados discordam dos encontrados por Tocantins (2007) que ao pesquisar a frequência e a distribuição espacial das infecções causadas por *Leptospira* spp. em bovinos na região do Pantanal, encontrou maiores porcentagens em animais entre 24- 36 meses e com mais de 36 meses.

Numerosos animais são hospedeiros de leptospiros, sendo que cada sorovar tem um ou mais hospedeiros, com graus diferentes de adaptação. Em decorrência dessa epidemiologia bastante dinâmica e complexa, envolvendo diferentes sorovares, diferentes espécies de suscetíveis e ainda a presença de fatores ambientais predisponentes, a doença deve ser estudada obedecendo às diferenças regionais quanto a esses fatores (ELLIS, 1984). Segundo Grooms (2006) os casos clínicos mais comuns de leptospirose entre bovinos são causados pelo sorovar Hardjo, por ser o mais adaptado a espécie bovina. A maior frequência de bovinos soropositivos para o sorovar Hardjo, com taxas de ocorrência mais elevadas no período seco ($p=0,031$), detectada neste trabalho sugere que a transmissão direta entre bovinos seja uma estratégia importante do patógeno para se manter entre o rebanho de um ano para outro. A transmissão da leptospira nesses rebanhos pode está ocorrendo através do sêmen dos reprodutores uma vez que é comum, nesta região, o empréstimo de touros entre as propriedades, não podendo ser descartada a possibilidade de transmissão da leptospira através da monta natural.

Em contraste, os outros sorovares diagnosticados, como por exemplo, Australis, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Patoc e Sentot são considerados acidentais para bovinos, e a transmissão indireta está associada ao contato com o meio ambiente contaminado por leptospiros oriundas de espécies silvestres ou de outras espécies domésticas (CASTRO, et al. 2008). Isso explicaria a maior ocorrência desses sorovares ($p=0,038$) durante o período de chuva.

Segundo Aycardi et al. (1982) o sorovar Hardjo, em bovinos, estimula a produção de títulos baixos e transitórios que podem não ser diagnosticados pela SAM. Com isso, foi então realizada a pesquisa de leptospiros por PCR nas amostras de ovários e epidídimos, de todos os animais do estudo independente da condição sorológica.

Desta forma, procurou-se entender um pouco mais sobre o sistema reprodutor como via de transmissão direta do agente entre os animais.

Nenhuma das amostras testadas foi positiva à PCR. A probabilidade de ocorrência de resultados falsos negativos foi minimizada pelos controles utilizados e pela sensibilidade analítica de 1pg/ µL de DNA bacteriano nas amostras de tecido obtida durante o pré-ensaio. Shimabukuro (2007) ao estudar a presença de leptospiros em ovários de camundongos experimentalmente infectados com estirpes patogênicas de *Leptospira interrogans* sorovar Pomona e Canicola, também encontrou resultado negativo para todos os animais na PCR. Porém Magajevski (2007) conseguiu detectar DNA de *Leptospira* spp. e *Brucella* spp. em pools de líquido folicular, através da PCR multiplex, no entanto este resultado foi obtido com outro enfoque, pois o autor provocou a contaminação do material com quantidades altas do microrganismo enquanto o presente trabalho foi realizado em animais naturalmente infectados.

Estes resultados negativos podem ter ocorrido por não haver a multiplicação da *Leptospira* spp nos tecidos dos animais analisados, sugerindo a não ocorrência da fase de leptospiremia e colonização do ovário e epidídimo. Outro fato que deve ser levando em consideração é que os títulos sorológicos apresentados por estes animais poderiam ser oriundos de resposta vacinal, portanto não estariam realmente infectados, o que seria menos provável já que a vacinação dos animais dessa região não é uma prática comum. Ou ainda em infecção recente, onde o animal apresentaria altos títulos sorológicos, sem, no entanto ter ocorrido a colonização dos órgãos estudados. E por fim, mas não menos importante, o pequeno número de leptospiros presentes nas amostras de ovário e epidídimo, insuficientes para a amplificação do DNA (SHIMABUKURO, 2007).

Outro fator a ser considerado foi a própria categoria dos animais estudados (Figura 1). Nos machos, houve predomínio de animais abatidos ainda jovens, antes da vida reprodutiva. Entre as fêmeas, o abate foi mais frequente em animais acima de 36 meses, e tal como observado durante o abate, muitos animais de descarte. Neste caso, como sugere a distribuição dos títulos de anticorpos aglutinantes detectados (Quadros 4 e 5), haveria animais fora da fase aguda, ou seja, livre de leptospiros nos órgãos, quando muito, portadores renais.

Apenas um animal foi sorologicamente reagente para brucelose (2-ME) e nenhuma amostra amplificou o DNA bacteriano (PCR). O animal soropositivo tratava-se de um macho, com idade superior a 36 meses, proveniente do município de Parau-RN, mas que foi abatido no abatedouro do município de Açu. Animais soro reagentes

para brucelose já foram relatados por Souza et al. (2009) no Estado do Rio Grande do Norte, na microrregião do Vale do Açu, porém com maior frequência (1,2%) e utilizando como o teste diagnóstico somente o AAT. O fato de somente um animal ter sido soropositivo não diminui a importância dessa enfermidade nos rebanhos bovinos, uma vez que a brucelose é uma importante zoonose, sendo a *Brucella abortus* responsável por consideráveis perdas econômicas devidos aos problemas reprodutivos e produtivos causados pelo microrganismo, que pode se localizar no sistema reprodutivo de touros e vacas, locais de predileção da bactéria devido ao seu tropismo pelo eritritol, substância presente nestes órgãos (BRASIL, 2006). Nos bovinos machos, como é o caso do animal positivo encontrado neste trabalho, a infecção pode causar orquite, epididimites e consequentemente infertilidade. Além disso, a bactéria também pode estar presente no sêmen e dessa forma propagar a doença através da inseminação artificial (HEINEMANN et al. 1999, GIVENS; MARLEY 2008).

Com relação a saúde pública, deve ser ressaltado a forma em que esses animais são abatidos, já que muitas vezes não existem municípios com abatedouros disponíveis ou adequados para a realização do abate. Com isso os animais são abatidos clandestinamente, sendo potenciais fontes de infecção para o homem (magarefes) bem como para animais que se alimentam dos restos de vísceras que são muitas vezes deixados a céu aberto sem nenhum tratamento. Durante o estudo dois abatedouros foram fechados, no entanto o abate e o consumo de carne não deixaram de existir aumentando ainda mais as chances de contaminação humana.

2.6 CONCLUSÕES

Levando em consideração as condições em que o estudo foi realizado, pode-se concluir que a infecção por *Leptospira* spp. em bovinos ocorre no semiárido do Rio Grande do Norte com maior frequência para o sorovar Hardjo durante o período seco do ano.

A brucelose foi detectada, mas com frequência muito baixa.

Não foi detectada a presença de DNA de *Leptospira* spp. e *Brucella* spp. nos ovários e epidídimos dos animais do estudo.

2.7 REFERÊNCIAS

ALVES, T.M. Participação dos receptores semelhantes ao *Toll* na indução de expressão de mRNA para CXCL8 (IL-8) na infecção *in vitro* de células epiteliais por *Campylobacter fetus* subsp. *Venerealis* e *Tritrichomonas foetus*. **Tese** (Doutorado em Ciência Animal), Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais. 61p. 2010.

AYCARDI, E.; RIVERA, B.; TORRES, B.; DE BOHORQUEZ, V. Experimental infection with a *Leptospira hardjo* strain isolated from cattle of the eastern plains of Colombia. **Veterinary Microbiology**, v. 7, n. 6, p. 545-550, 1982.

BAILY, G. G.; KRAHN, J. B.; DRASAR, B. S.; SOKER, N.G. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. **The Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 4, p. 271-275, 1992.

BIELANSKI, A.; SURUJBALLI, O.; THOMAS, E. G.; TANAKA, E. Sanitary status of oocytes and embryos collected from heifers experimentally exposed to *Leptospira borgpetersenii* serovar *hardjobovis*. **Animal Reproduction Science**, v.54, p.65–73, 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. MAPA. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT)**. 188p, Brasília: MAPA/SDA/DAS, 2006.

CASTRO, V.; AZEVEDO, S.S.; GOTTI1, T. B.; BATISTA, C. S. A.; GENTILI, J.; MORAES. Z. M.; SOUZA, G. O.; VASCONCELLOS, S. A.; GENOVEZ, M. E. Soroprevalência da leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.75, n.1, p.3-11, 2008.

COSTA, M. C. R; MOREIRA, E. C; LEITE, R. C; MARTINS, N. R. S. Avaliação da imunidade cruzada entre *Leptospira* Hardjo e *L. Wolffi*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.50, n.1, p.11-17, 1998.

COLE, JUNIOR J. R.; SULZER, C.R.; PURSELL, A. R. Improved microtechnique for agglutination test. **Applied Microbiology**, n.25, p.970-980, 1973.

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

FAO. **Food and Agriculture Organization of the The United Nations**. 2010. Disponível em: faostat.fao.org/site/339/default.aspx. Acesso em: 10/04/2012.

FAVERO, M.; PINHEIRO, S.R.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z. M.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S. Leptospirose bovina - variantes sorológicas predominantes em colheitas efetuadas no período de 1984 a 1997 em rebanhos de 21 estados do Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 68, n. 2, p.29-35, 2001.

GALTON, M. M., SULZER, C. R.; SANTA ROSA, C. A.; FIELDS, M. J. Application of a microtechnique to the agglutination test for leptospiral antibodies. **Applied Microbiology**, n.13, p.81-85, 1965.

GIVENS, A. D.; MARLEY, M. S. D. Pathogens that cause infertility of bulls or transmission via semen. **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 504-507, 2008.

GONÇALVES, A. T.; PAIVA, C.; MELO-MOTA, F.; VIEIRA, M. L.; CARREIRA, T.; NUNES, M. S.; MOTA-VIEIRA, L.; AHMED, A.; HARSTKEERL, R. A.; HYDE, K.; COLLARES-PEREIRA, M. First isolation of human *Leptospira* strains, Azores, Portugal. **International journal of infectious diseases**, v. 14, suppl. 3, p. 148-153, 2010.

GROOMS, D. L. Reproductive losses caused by bovine viral diarrhea virus and leptospirosis. **Theriogenology**, v. 66, n. 3, p. 624-628, 2006.

HAMDY, M. E. R.; AMIN, A. S. Detection of Brucella Species in the Milk of Infected Cattle, Sheep, Goats and Camels by PCR. **The Veterinary Journal**, v. 163, n. 3, p. 299-305, 2002.

HEINEMANN, M. B.; GARCIA, J. F.; NUNES, C. M.; MORAIS, Z. M.; GREGORI, F.; CORTEZ, A.; VASCONCELLOS, S. A.; VISINTIN, J. A.; RICHTZENHAIN, L. J.. Detection of Leptospire in Bovine Semen by Polymerase Chain Reaction. **Australian Veterinary Journal**. v.77, n.1, p.32–34, 1999.

HEINEMANN, M. B.; GARCIA, J. F.; NUNES, C. M.; GREGORI, F.; HIGA, Z. M. M.; VASCONCELLOS, S. A.; RICHTZENHAIN, L. J. Detection and differentiation of Leptospira spp. serovars in bovine semen by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. **Veterinary Microbiology**, v. 73, n. 4, p. 261-267, 2000.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. 2010. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=2002&id_pagina=1. Acesso em: 26/07/2012.

IDEMA. **Instituto de desenvolvimento Sustentável e Meio Ambiente do Rio Grande do Norte**. Anuário Estatístico. 2010. Caracterização do território, recursos naturais e meio ambiente. Disponível em: http://www.idema.rn.gov.br/contentproducao/aplicacao/idema/socio_economicos/arquivos/anuario-CDROM%202010/index.htm. Acesso em: 26/07/2012.

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

JUNQUEIRA, J. R. C; FREITAS, J. C.; ALFIERI, A. F; ALFIERI, A. A. Avaliação do desempenho reprodutivo de um rebanho bovino de corte naturalmente infectado com o BoHV-1, BVDV e Leptospira hardjo. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, n. 3, p. 471-480, 2006.

MAGAJEVSKI, F. S.; GIRIO, R. J. S.; MATHIAS, L. A.; MYASHIRO, S.; GENOVEZ, M. É.; SCARCELLI, E. P. Detection of *Leptospira* spp. in the semen and urine of bulls serologically reactive to *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 43-45, 2005.

MAGAJEVSKI, F.S. 2007. 83p. *Leptospira* spp. e *Brucella* spp. em fetos e oócitos colhidos de vacas no momento do abate. Tese de doutorado, Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade estadual Paulista. Jaboticabal, SP.

MAGAJEVSKI, F.S.; GIRIO, R. J. S. Avaliação da sensibilidade da PCR frente a quatro técnicas para extração de DNA de *Leptospira interrogans* sorovar Pomona em sêmen bovino experimentalmente contaminado. **Ars Veterinaria**, v. 24, n. 1, p. 29-33, 2009.

MÉRIEN, F.; AMOURIAUX, P.; PEROLAT, P.; BARANTON, G.; GIRON, I. S. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 9, p. 2219-2224, 1992.

MESQUITA, M.; PELLEGRINI, D. C. P.; SIMÕES PIRES NETO, J. A.; REIS, G. R.; MEDEIROS, C.; CORBELLINI, L. G. Análise de série temporal para avaliação do perfil sorológico da leptospirose bovina no Estado do Rio Grande do Sul de 1996 a 2006. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, n.3, p.381-387, 2010.

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

MINEIRO, A. L. B. B.; VIEIRA, R. J.; COSTA, E. A.; SANTOS, R. L.; GONÇALVES, L. M. F.; CARVALHO, S. M.; BOMFIM, M. R. Q; COSTA, F. A. L. Serology, polymerase chain reaction and histopathology for leptospirosis in samples collected at slaughter from dairy cows of Parnaíba region, state of Piauí, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 10, p. 859-866, 2011.

OLIVEIRA, C. S.; AZEVEDO, S. S.; PINHEIRO, S. R.; BATISTA, A. S.; MORAES, Z. M.; SOUZA, G. O.; GONÇALVES, A. P.; VASCONCELLOS, A. S. Fatores de risco para a leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no Estado da Bahia, Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 5, p. 398-402, 2010.

POESTER, F.; FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBO, J.R.; GONÇALVES, V. S. P; LAGE, A. P.; ROXO, E.; MOTA, P. M. P. C.; MÜLLER, E. E.; FERREIRA NETO, J. S. Estudos de prevalência da brucelose bovina no âmbito do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose: Introdução. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 01-05, 2009.

RICHTZENHAIN, L. J.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M. B.; SOARES, R. M.; SAKAMOTO, S. M.; VASCONCELLOS, S. A.; HIGA, Z. M. M.; SCARCELLI, E.; GENOVEZ, M. E. A multiplex PCR for the detection of *Brucella* spp. and *Leptospira* spp. DNA from aborted bovine fetuses. **Veterinary Microbiology**, v. 87, n. 2, p. 139-147, 2002.

ROMERO, C.; LOPEZ-GOÑI, I. Improved Method for Purification of Bacterial DNA from Bovine Milk for Detection of *Brucella* spp. by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 8, p. 3735-3737, 1999.

SHIMABUKURO, F. H. Avaliação sorológica e detecção molecular de leptospiros em tecidos de camundongos experimentalmente infectados com estirpes patogênicas de *Leptospira interrogans* sorovar pomona e canicola. **Tese** (Doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista. 100p. 2007.

SOUZA, C. H.; ARAÚJO, K. S. M.; SILVA, J. A. Ocorrência de brucelose bovina na região do Vale do Assu no Estado do Rio Grande do Norte. 2009. Anais do Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária. Porto Seguro – BA.

TOCANTINS, S. Distribuição espacial da prevalência de aglutininas anti-leptospira em bovinos em Cáceres, MT, Brasil. **Tese** (Doutorado em Ciência Animal), Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais. 81p. 2007.

ANEXOS

ANEXO I- CARTA DE SUBMISSÃO DO ARTIGO “PESQUISA DE *LEPTOSPIRA* SPP. E *BRUCELLA* SPP. EM OVÁRIOS E EPIDÍDIMOS DE BOVINOS EM ABATEDOUROS PÚBLICOS NO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE” À REVISTA PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA.



Pesquisa Veterinária Brasileira

Brazilian Journal of Veterinary Research
Caixa Postal 74591, Seropédica, RJ, 23890-000, Brasil.

Tel/fax: +55 (21) 2662-1081

<www.pvb.com.br> pyb@pyb.com.br

DECLARAÇÃO

Acusamos o recebimento do artigo “**Pesquisa de *Leptospira* spp. e *Brucella* spp. em ovários e epidídimos de bovinos em abatedouros públicos no Estado do Rio Grande do Norte**”, de autoria de Kênia S.M. de Araújo, Sidnei M. Sakamoto, Carlos H. de Souza, Elaine M.S. Dorneles, Marcos B. Heinemann, Andrey P. Lage e Gisele O. de Souza, em submissão para publicação na revista Pesquisa Veterinária Brasileira.

O artigo será registrado e esse número de registro fornecido ao autor para correspondência (Kênia S.M. de Araújo), para que através dele, possa ser feito o acompanhamento do trâmite até o aceite para publicação.

Rio de Janeiro, em 23 de agosto de 2012

Editor da Pesq. Vet. Bras.

ANEXO II- ARTIGO SUBMETIDO AO PERÍODICO: PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA

Kênia S.M. de Araújo^{2*}, Sidnei M. Sakamoto², Carlos H. de Souza², Elaine M. S. Dorneles³, Marcos B. Heinemann⁴, Andrey P. Lage³ e Gisele O. de Souza⁴

ABSTRACT.- Araújo K.S.M., Sakamoto S.M.S., Souza C.H., Dorneles E.M.S., Heinemann M.B. & Lage A.P. 2012. [Search of *Leptospira* spp. and *Brucella* spp. in ovaries and epididymis in bovines from public slaughterhouse in the State of Rio Grande do Norte] Pesquisa de *Leptospira* spp. e *Brucella* spp. em ovários e epidídimos de bovinos em abatedouros públicos no Estado do Rio Grande do Norte. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Departamento de Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semiárido, Avenida Francisco Mota, nº. 572, Costa e Silva. CEP 59.625-900 RN. Mossoró, Brasil. *E-mail: keniasuenia@hotmail.com

This work was aimed at researching anti-*Leptospira* spp. and anti-*Brucella* spp. agglutinins in cattle slayed in public slaughterhouses in the State of Rio Grande do Norte, as well as confirm the presence of these agents through PCR in the ovaries and epididymis of the slaughtered animals. For such purpose, serum, and ovary or epididymis were collected from cattle in a normal slaughter line. Through the Microscopic Agglutination Test (MAT), we found that 189 (61.76%) animals were positive for *Leptospira* spp, where the predominant serovar was Hardjo (24.9%), followed by Wolffi, Butembo, Icterhaemorrhagiae, and Hebdomadis who contributed with frequencies ranging from 14.8% to 2.6%. Lower frequencies were found for the serovars Australis, Pomona, Grippotyphosa, Patoc, Canicola, Autumnalis, and Sentot. On a separate analysis, the serovar Hardjo showed greater occurrence in the dry period when compared to the rainy period ($p=0.031$). To search for brucellosis, animals were screened by the Buffered Acidified Antigen test (BAA) and results were confirmed by the 2-mercaptoethanol (2-ME) test. Three animals were positive for the BAA test, however only one of these reacted positively to 2-ME. PCR was used to detect bacterial DNA in samples of ovary and epididymis. Not one of the samples was positive, through the PCR technique, to detect DNA from *Brucella* spp. and *Leptospira* spp. Given the above mentioned data is concluded that the *Leptospira* spp. infection in bovines happens, in the semiarid region of Rio Grande do Norte, with greater frequency for the serovar Hardjo during the dry period of the year. Brucellosis was detected but in lower frequencies. Through PCR, DNA from *Leptospira* spp. and *Brucella* spp. was not detected in the ovaries and epididymis samples of the animals.

Keywords: Infectious diseases, *Leptospira* spp., *Brucella* spp., Ovary, Epididymis, and PCR.

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

² Departamento de Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA), Av. Francisco Mota, 572. Bairro: Costa e Silva. CEP: 59.625-90, Mossoró, RN 59625-900, Brasil. *Autor para correspondência: E-mail: keniasuenia@hotmail.com, smsakamoto@gmail.com, carloshsouzavet@hotmail.com, selesdorneles@yahoo.com.br, mabryan@vet.ufmg.br, alage@vet.ufmg.br e ginutri@usp.br

³ Laboratório de Bacteriologia Aplicada, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG 30270-010, Brasil.

⁴ Laboratório de Vírus, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG 30270-010, Brasil.

⁵ Lab Zoonoses Bacterianas, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, FMVZ-USP. Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87 Cidade Universitária. CEP 05508-570 São Paulo-SP.

RESUMO – Objetivou-se pesquisar aglutininas anti-*Leptospira* spp. e anti-*Brucella* spp. em bovinos oriundos de abatedouros públicos do Estado do Rio Grande do Norte, bem como confirmar através da PCR, a presença desses agentes nos ovários e epidídimos desses animais. Para isso, foi coletado durante a linha normal de abate, o sangue e ovário ou epidídimo. Através da Reação de Soroaglutinação Microscópica (SAM) foram detectados 189 (61,76%) animais sororreagentes para *Leptospira* spp., sendo o sorovar Hardjo (24,9%) o mais predominante, seguido do Wolffi, Butembo, Icterhaemorrhagiae e Hebdomadis que contribuíram com frequências que variaram de 14,8% a 2,6%. Os sorovares Australis, Pomona, Grippotyphosa, Patoc, Canícola, Autumnalis e Sentot foram menos frequentes. Em análise em separado o sorovar Hadjo apresentou maior ocorrência no período seco do que no chuvoso ($p=0,031$). Para a brucelose os animais foram triados através da prova do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e confirmados pela prova do 2-mercaptoetanol (2-ME). Três animais foram positivos ao AAT, desses apenas um reagiu positivamente ao 2-ME. A PCR foi utilizada para detecção do DNA bacteriano nas amostras de ovário e epidídimo. Nenhuma amostra foi positiva na PCR para detecção de DNA da *Brucella* spp. e *Leptospira* spp. Diante do exposto conclui-se que a infecção por *Leptospira* spp. em bovinos ocorre no semiárido do Rio Grande do Norte com maior frequência para o sorovar Hardjo durante o período seco do ano. A brucelose foi detectada, mas com baixa frequência. Através da PCR não foi detectado DNA de *Leptospira* spp. e *Brucella* spp. nos ovários e epidídimos dos animais.

Palavras Chave: Doenças infecciosas, *Leptospira* spp., *Brucella* spp., Ovário, epidídimo e PCR.

INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta o segundo maior rebanho bovino comercial do mundo com mais de 209,541 milhões de cabeças (IBGE, 2010), sendo um grande exportador de carne bovina e é o quarto maior produtor mundial de leite chegando a uma produção de mais de 31,6 bilhões de litros, ficando atrás apenas dos EUA, Índia e China (FAO, 2010). Apesar disso, os níveis de produção e produtividade nacional, dos rebanhos de corte e leite, ainda são muito baixos, sobretudo na região do semiárido nordestino. Nos bovinos, os problemas sanitários são multifatoriais (Junqueira et al. 2006), mas destaca-se a importância da brucelose e leptospirose (Mineiro et al. 2007, Poester et al. 2009).

Causadas respectivamente pela *Leptospira* spp e *Brucella abortus* estas doenças são caracterizadas por distúrbios reprodutivos em bovinos, por aumentarem o risco de abortamentos, natimortos, nascimento de bezerros fracos e diminuição na produção de leite, levando a consideráveis perdas econômicas. Além disso, são importantes zoonoses que acometem principalmente veterinários, laboratoristas, trabalhadores rurais e de abatedouros, por ficarem mais expostos às fontes de contaminação, mostrando serem doenças com forte caráter ocupacional (Gonçalves et al. 2010).

Tanto a brucelose quanto a leptospirose podem ser diagnosticadas através de métodos sorológicos, pela detecção de anticorpos específicos no soro, porém estes métodos podem dar resultados falsos positivos ou falsos negativos. Métodos diretos de detecção do agente no hospedeiro são mais objetivos. O isolamento bacteriano, considerado um método direto é usualmente empregado, no entanto é mais difícil, demorado e perigoso (Richtzenhain et al. 2002). Com o advento da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), vários trabalhos já foram desenvolvidos empregando esta técnica como método diagnóstico na detecção de leptospirose (Mérien et al. 1992, Bielanski et al. 1998, Heinemann et al. 2000, Magajevski et al. 2005, 2008) e brucelose (Romero & Lopez-Goñi 1999, Hamdy & Amin 2002) a partir de tecidos e fluidos orgânicos.

Mesmo com as técnicas disponíveis para o diagnóstico da leptospirose e brucelose pouco se conhece sobre a real situação sanitária do rebanho bovino abatido no Estado do Rio Grande do Norte, frente a estas doenças. Além disso, a leptospirose e brucelose são importantes doenças que acometem o trato reprodutivo de touros e vacas. Portanto, se objetivou detectar a presença de aglutininas anti-*Leptospira* spp e anti-*Brucella abortus* em bovinos oriundos de abatedouros públicos do Estado do Rio Grande do Norte bem como confirmar a presença desses agentes nos ovários e epidídimos dos animais abatidos, através da PCR.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado em abatedouros públicos municipais, da região semiárida do Estado do Rio Grande do Norte. As colheitas foram realizadas nos estabelecimentos que permitiram o acesso e foram autorizadas pelos responsáveis técnicos dos mesmos. Portanto, foram incluídos neste estudo, os abatedouros pertencentes aos Municípios de Açu, Alto do Rodrigues e São Vicente. Os dois primeiros localizados na microrregião do Vale do Açu e o terceiro na da Serra de Santana. O clima predominante nestas áreas é o semiárido, caracterizado por longos períodos de seca, com temperaturas que chegam a ultrapassar os 26°C, chuvas escassas e irregulares, com pluviosidade abaixo de 600 mm anuais (IDEMA 2010). As colheitas de amostras foram realizadas entre dezembro de 2010 e agosto de 2011, abrangendo meses de chuva, março a junho, e os demais, classificados como meses de seca.

O sangue, ovário ou epidídimo dos 306 bovinos, foram coletados durante a linha de abate sem nenhuma interferência quanto ao sexo, idade, raça ou local de origem. O sangue foi obtido durante o processo da sangria para a obtenção do soro, e foi realizada em tubo vacutainer de 10 ml, sem anticoagulante, devidamente identificado. Após a retração do coágulo, o material foi centrifugado a 2.000 x g por 5 minutos, e uma alíquota do soro foi retirada para realização do teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT). O restante do material foi alíquotado em microtubos de 1,5 ml, com sua respectiva identificação e mantido à -20 °C até o momento do processamento.

Os epidídeos e ovários foram coletados, seguindo a linha de abate, armazenados em coletores universais estéreis, devidamente identificados e transportados em caixas isotérmicas com gelo reciclável até a chegada ao laboratório, onde foi transferido para freezer a -20 °C até o processamento.

O diagnóstico sorológico para infecção de *Leptospira* foi realizado através do teste de soroaglutinação microscópica (SAM), no Laboratório de Zoonoses Bacteriana da Universidade de São Paulo, seguindo a metodologia proposta por Galton (1965) e Cole (1973), utilizando uma coleção de culturas vivas de *Leptospira* spp. com um representante de cada sorogrupo, totalizando 25 variantes sorológicas: Australis, Bratislava, Autumnalis, Butembo, Castellonis, Bataviae, Canicola, Whitcombi, Cynopteri, Grippotyphosa, Hebdomadis, Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Panama, Pomona, Pyrogenes, Hardjo (estirpes Hardjoprajitno e Hardjobovis), Wolffi, Shermani, Tarassovi, Andamana, Patoc e Sentot. Os soros foram triados na diluição de 1:100 e aqueles que apresentaram 50% ou mais de aglutinação foram titulados por meio de diluições geométricas na razão dois. O título do soro foi a recíproca da maior diluição que apresentou resultado positivo. O ponto de corte utilizado foi o título 100.

A sorologia para brucelose foi realizada através da prova do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT) e 2-Mercaptoetanol (2-ME), o primeiro como teste de triagem e o segundo como teste confirmatório e foram realizados segundo as orientações do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal – PNCEBT (BRASIL, 2006).

As amostras de ovário e epidídimo foram, uma a uma, fragmentadas com o auxílio de bisturi estéril, em placas de petri descartáveis. Em seguida, foi adicionado 50 ml de tampão fosfato salino (PBS) 1X, estéril, ao saco stomacher juntamente com o tecido fragmentado. Esse material foi colocado em aparelho homogeneizador de amostras, programado com 490 golpes/minuto, durante 10 minutos. Após a homogeneização, uma alíquota de 1ml foi transferida para microtubos de 1,5ml, livres de DNase e RNase. Essa alíquota foi centrifugada por 5 minutos à 10.000x g. Em seguida o sobrenadante foi descartado e o material armazenado, quando se obteve um pellet de 25mg, à -20 °C, até o momento da extração do DNA.

A extração do DNA foi realizada utilizando o Kit Promega ReliaPrep™ gDNA tissue Miniprep Systems® conforme recomendações do fabricante. Após a extração, o DNA foi quantificado por espectrofotometria a 260 nm, diluído e alíquotado em concentrações decrescentes e realizou-se o teste de sensibilidade analítica para 10 e 1 ng, 100, 10 e 1 pg e 100, 10 e 1 fg/ µL, a fim de detectar a eficiência da reação. O teste foi realizado tanto para a cultura pura quanto para os tecidos (ovário e epidídimo), contaminados com as quantidades de DNA citadas anteriormente. O teste foi feito utilizando-se como amostras de referência cepa de *L. Hadjobovis* e *L. Icterohaemorrhagiae*. Para o teste de sensibilidade analítica da *Brucella* spp, utilizou-se como amostras de referencia *B. abortus* (biovariedade 1, amostra 544), com as mesmas concentrações empregadas para leptospiros.

Para amplificação de DNA de *Leptospira* spp. foram propostos os oligonucleotídeos iniciadores gênero

específicos Lep 1 (5' GGCGGCGCGTCTTAAACATG 3') e Lep 2 (3' TTAGAACGAGTTACCCCCCTT 5') descritos por Mérien et al. (1992), e para *Brucella* sp., os *primers*, gênero específicos, B4 (5' TGGCTCGGTTTGCCAATATCAA 3') e B5 (3' CGCGCTTGCCCTTCAAGGTCTG 5'), descritos por Baily et al. (1992). O gene da desidrogenase gliceraldeído-3-fosfato (GAPDH) foi utilizado como controle da extração, sendo utilizado os *primers* (senso 5'ATGGTGAAGGTCGGAGTGAACG3') e (antisenso 5'TGTAGTGAAGGTCAATGAAGGGGTC3'), descritos por Alves (2010).

O Mix da PCR para o GAPDH foi preparado para uma reação de 25µL, contendo: 11,00 µL de água milliQ, 2,5 µL de tampão IO 10x (Phoneutria®, Belo Horizonte, MG, Brazil), 2,5 µL de dNTP (2 mM), 2,5 µL de cada *primer* (10 µM), GAPDH Senso e GAPDH antisenso (10µM), 1,5 µL de MgCl₂ (50 mM) e 0,5µL da enzima Taq Polimerase (5U/µL) Phoneutria ®. Para a PCR da *Leptospira* o mix foi preparado com 11,25 µL de água milliQ, 2,5 µL de tampão IO 10X (Phoneutria®, Belo Horizonte, MG, Brazil), 2,5 µL de dNTP (2 mM), 2,5 µL de cada *primer*, LEP 1 e LEP 2 (10µM), 1 µL de MgCl₂ (50mM) e 0,25µL da enzima Taq Polimerase (5U/µL) Phoneutria® e 2,5 µL do DNA da amostra a ser analisada, completando uma reação de 25µL. E para *Brucella* o mix foi realizado para uma reação de 25µL, contendo: 10,00 µL de água milliQ, 2,5 µL de tampão IO 10X (Phoneutria®), 2,5 µL de dNTPs (2mM), 2,5 µL de cada *primer* B4 e B5 (10 µM), 1,5 µL de MgCl₂ (50mM) e 0,5µL da enzima Taq Polimerase (5U/ µL) (Phoneutria®). Por fim, acrescentou-se 3,0 µL do DNA da amostra a ser analisada. A condição de amplificação para cada reação está descrita no quadro 1.

Os produtos da amplificação pela PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, em tampão Tris-borato-EDTA (TBE) (89mM Tris Base, 89mM ácido bórico e 2mM EDTA pH8.0) (Sigma, EUA), por 80 minutos a 100 volts, utilizando o brometo de etídeo (0,5mg/mL), como corante evidenciador do DNA. Um marcador de peso molecular 1kb plus DNA Ladder (Invitrogen, EUA) foi utilizado como parâmetro de avaliação do tamanho das bandas geradas. Seguida a eletroforese, os géis foram observados à luz ultravioleta e fotografados. (L-PIX EX, Loccus Biotecnologia, Brasil).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram empregados testes não paramétricos (qui-quadrado e Kruskal-Wallis para amostras independentes), adotando-se o nível de significância 0,005 com auxílio do programa IBM® SPSS® Statistics versão 20.

RESULTADOS

O estudo foi realizado em três abatedouros do Rio Grande do Norte (Açu, Alto do Rodrigues e São Vicente) e abrangeu os municípios de Açu, Angicos, Alto do Rodrigues, Carnaubais, Ipanguaçu, Janduis, Paraú, Pendências, Santana dos Matos, São Vicente, Triunfo Potiguar e Upanema, já que os animais abatidos procediam desses municípios. Todos os abatedouros e municípios que foram incluídos neste estudo apresentaram pelo menos uma amostra positiva, para um dos 25 sorovares diferentes de *Leptospira* spp. estudadas. Dos 306 animais testados, 189 (61,8%) reagiram positivamente ao teste de soroprecipitação microscópica. Destes, 118 (62,4%) foram reagentes a pelo menos uma das 25 amostras de *Leptospira* spp. testadas e 71 (37,6%) reagiram positivamente para múltiplas amostras. O sorovar mais frequente entre os animais que reagiram para apenas um sorovar foi o Hardjo que contribuiu com 24,9% dos resultados positivos, destes a estirpe Hardjoprajitno apresentou 14,8% e a Hardjobovis 10,1%. O segundo sorovar mais frequente foi o Wolffi com 14,8%, seguidos por Butembo, Icterhaemorragiae e Hebdomadis que contribuíram com frequências que variaram de 6,9% a 2,6%. Menores frequências foram encontradas para os sorovares Australis (1,6%), Pomona (1,1%), Grippotyphosa (1,1%) e Patoc (1,1%). Canícola, Autumnalis e Sentot tiveram frequências menores do que 1% (Quadro 2).

Quanto ao sexo, 52,9% dos animais do estudo eram fêmeas e 47,1% machos. Dos bovinos positivos para apenas um sorovar, tanto as fêmeas quanto os machos apresentaram o sorovar Hardjo como o mais frequente.

Em relação a faixa etária trabalhada (13-24, 25-36 e acima de 36 meses), observou-se que todas foram afetadas, com maior frequência para os animais mais novos (Quadro 3). Entretanto, uma análise em separado da estratificação etária por sexo, mostrou predomínio de animais com mais de 36 meses nas fêmeas e, nos machos, um predomínio dos animais agrupados na idade entre 25 e 36 meses a ($p < 0,001$), como mostra a Figura 2. Não houve diferença quanto à estratificação etária quando comparados o grupo dos animais infectados com os não infectados.

A partir da análise dos dados foi possível observar comportamentos opostos entre o padrão de distribuição das taxas de ocorrência nas diferentes épocas do ano (chuva e seca). Quando foram analisados todos os sorovares com exceção do Hardjo e quando esta análise foi feita apenas para o Hardjo. Na primeira situação (sem Hardjo), foram verificados maiores medianas no período de chuvas ($p=0,031$) (figura 3) concordando com os achados de que em períodos de maior índices pluviométricos ocorre uma maior incidência da doença. Em contraposição, quando da análise isolada para o sorovar Hadjo, as taxas de ocorrência foram maiores no período seco quando comparado ao período chuvoso (figura 4).

Três animais foram reagentes ao teste do AAT, porém apenas um (0,32%) apresentou reação positiva no teste confirmatório do 2 - ME (SAL=200 e 2-ME=100). Este animal foi abatido no abatedouro do município de Açu, mas era oriundo do município de Parau-RN. Tratava-se de um macho com mais de 36 meses de idade.

No teste de sensibilidade analítica para *Leptospira* foi possível detectar até 1pg/ μ L, tanto para cultura (Figura 5, canaletas 2 a 9), como para a tecido contaminado com a cultura (Figura 5, canaletas 10 a 17). Para a *Brucella abortus* o teste apresentou uma sensibilidade analítica de até 10ng/ μ L para a cultura mais o tecido (Figura 6, canaletas 1 a 8), e de 100pg/ μ L para a cultura pura (Figura 6, canaletas 9 a 16).

Não foram detectados presença de DNA de *Leptospira* spp. e *Brucella* spp. nas amostras de ovários e epidídimos nos animais do estudo. Todas as amostras amplificaram para o GAPDH, mostrando que tinha DNA bovino nas amostras analisadas e que extração foi eficiente (figura 7).

DISCUSSÃO

Investigação de aglutininas anti-leptospira e anti-brucela em animais de abatedouros não é o mais apropriado para determinar a prevalência em uma certa região, pois há limitações quanto ao número e as diferentes origens dos animais. Entretanto, ela permite obter uma noção geral da sua ocorrência e pode sugerir quais agentes possuem maior importância na região de origem dos animais.

Considerou-se o sorovar de maior título como o sorovar mais provável e, os animais com os títulos mais elevados idênticos para dois ou mais sorovares foram classificados como animais soropositivos sem a possibilidade de identificação do sorovar. O sorovar mais provável mais prevalente neste estudo foi o Hardjo (genotipos Hardjobovis e Hardjopravito), que ocorreu em 24,9% dos animais soro reagentes. O predomínio deste sorovar está de acordo com vários estudos com bovinos desenvolvidos em diferentes regiões do Brasil: na região do Parnaíba no Piauí (Mineiro et al. 2011), na Bahia (Oliveira et al. 2010), em São Paulo (Castro et al. 2008) e no Rio Grande do Sul (Mesquita et al. 2010). Favero et al. (2001) encontraram o sorovar Hardjo como o mais prevalente em 21 estados brasileiros, no soro de 31.325 bovinos amostrados. Todavia, resultados diferentes foram encontrados por Juliano et al. (2000) que obtiveram o sorovar Wolffi como mais frequente, com o sorovar Hardjo aparecendo com apenas 5,20% dos animais positivos.

O segundo sorovar mais frequente encontrado foi o Wolffi (14,8%) que também se destaca pela sua alta frequência em bovinos no Brasil, onde as reações cruzadas entre Hardjo e Wolffi são muito comuns devido às relações antigênicas existentes entre ambos, e por isso são classificados no mesmo sorogrupo, o Sejroe (Costa et al. 1998).

Não houve diferença estatística significativa entre a ocorrência de machos e fêmeas. Com relação as faixas etárias estudadas (12-24, 24-36 e >36 meses) foi possível observar que todas foram acometidas, mostrando que a leptospirose se apresenta de forma endêmica em todas as faixas etárias. Os bovinos com idade entre 12-24 meses apresentaram uma maior porcentagem de animais reagentes com 76,47%. Este resultado mostra que os animais estão se infectando ainda quando jovens, tornando-se prováveis portadores renais, eliminando as bactérias e infectando outros animais susceptíveis. Este dados discordam dos encontrados por Tocantins (2007) que ao pesquisar a frequência e a distribuição espacial das infecções causadas por *Leptospira sp* em bovinos na região do Pantanal, encontrou maiores porcentagens em animais entre 24- 36 meses e com mais de 36 meses.

Numerosos animais são hospedeiros da leptospira, sendo que cada sorovar tem um ou mais hospedeiros, com graus diferentes de adaptação. Em decorrência dessa epidemiologia bastante dinâmica e complexa, envolvendo diferentes sorovares, diferentes espécies de suscetíveis e ainda a presença de fatores ambientais predisponentes, a doença deve ser estudada obedecendo às diferenças regionais quanto a esses fatores (Ellis, 1984). Segundo Grooms (2006), os casos

clínicos mais comuns de leptospirose entre bovinos são causados pelo sorovar Hardjo, por ser o mais adaptado a espécie bovina. A maior frequência de bovinos soropositivos para o sorovar Hardjo, com taxas de ocorrência mais elevadas no período seco ($p=0,031$), detectada neste trabalho sugere que a transmissão direta entre bovinos seja uma estratégia importante do patógeno para se manter entre o rebanho de um ano para outro. A transmissão da leptospira nesses rebanhos pode está ocorrendo através do sêmen dos reprodutores uma vez que é comum, nesta região, o empréstimos de touros entre as propriedades, não podendo ser descartada a possibilidade de transmissão da leptospira, através da monta natural.

Em contraste, os outros sorovares diagnosticados, como por exemplo, Australis, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Patoc e Sentot são considerados acidentais para bovinos, e a transmissão indireta está associada ao contato com o meio ambiente contaminado por leptospiiras oriundas de espécies silvestres ou de outras espécies domésticas (Castro et al. 2008). Isso explicaria a maior ocorrência ($p=0,038$) durante o período de chuva.

Segundo Aycardi et al (1982) o sorovar Hardjo, em bovinos, estimula a produção de títulos baixos e transitórios que podem não ser diagnosticados pela SAM. Com isso, foi então realizada a pesquisa de leptospiiras por PCR nas amostras de ovários e epidídimos, de todos os animais do estudo independente da condição sorológica. Desta forma, procurou-se entender um pouco mais sobre o sistema reprodutor como via de transmissão direta do agente entre os animais.

Nenhuma das amostras testadas foi positiva à PCR. A probabilidade de ocorrência de resultados falsos negativos foi minimizada pelos controles utilizados e pela sensibilidade analítica de $1\text{pg}/\mu\text{L}$ de DNA bacteriano nas amostras de tecido obtida durante o pré-ensaio. Shimabukuro (2007) ao estudar a presença de leptospiiras em ovários de camundongos experimentalmente infectados com estirpes patogênicas de *Leptospira interrogans* sorovar Pomona e Canicola, também encontrou resultado negativo para todos os animais na PCR. Porém Magajevski (2007) conseguiu detectar DNA de *Leptospira* spp. e *Brucella* spp. em pools de líquido folicular, através da PCR multiplex, no entanto este resultado foi obtido com outro enfoque, pois o autor provocou a contaminação do material com quantidades altas do microrganismo enquanto o presente trabalho foi realizado em animais naturalmente infectados.

Estes resultados negativos podem ter ocorrido por não haver a multiplicação da *Leptospira* spp nos tecidos dos animais analisados, sugerindo a não ocorrência da fase de leptospiremia e colonização do ovário e epidídimo. Outro fato que deve ser levando em consideração é que os títulos sorológicos apresentados por estes animais poderiam ser oriundos de resposta vacinal, portanto não estariam realmente infectados, o que seria menos provável já que a vacinação dos animais dessa região não é uma prática comum. Ou ainda em infecção recente, onde o animal apresentaria altos títulos sorológicos, sem, no entanto ter ocorrido a colonização dos órgãos estudados. E por fim, mas não menos importante o pequeno número de leptospiiras presentes nas amostras de ovário e epidídimo, insuficientes para a amplificação do DNA (Shimabukuro 2007).

Outro fator a ser considerado foi a própria categoria dos animais estudados (Figura 1). Nos machos, houve predomínio de animais abatidos ainda jovens, antes da vida reprodutiva. Entre as fêmeas, o abate foi mais frequente em animais acima de 36 meses, e tal como observado durante o abate, muitos animais de descarte. Neste caso, como sugere a distribuição dos títulos de anticorpos aglutinantes detectados (Quadros 4 e 5), haveria animais fora da fase aguda, ou seja, livre de leptospiiras nos órgãos, quando muito, portadoras renais.

Apenas um animal foi sorologicamente reagente para brucelose (2-ME) e nenhuma amostra amplificou o DNA bacteriano (PCR). O animal soropositivo, tratava-se de um macho, com idade superior a 36 meses, proveniente do município de Parau, mas que foi abatido no abatedouro do município de Açú. Animais soro reagentes para brucelose já foram relatados por Souza et al. (2009) no Estado do Rio Grande do Norte, na microrregião do Vale do Açú, porém com maior frequência (1,2%) e utilizando como o teste diagnóstico somente o AAT. O fato de somente um animal ter sido soropositivo não diminui a importância dessa enfermidade nos rebanhos bovinos, uma vez que a *Brucella abortus* é responsável por consideráveis perdas econômicas devidos aos problemas reprodutivos e produtivos causados pela bactéria, que pode se localizar no sistema reprodutivo de touros e vacas, locais de predileção da bactéria devido ao seu tropismo pelo eritritol, substância presente nestes órgãos (Brasil 2006). Nos bovinos machos, como é o caso do animal positivo encontrado neste trabalho, a infecção pode causar orquite, epididimites e consequentemente infertilidade. Além disso, a bactéria também pode está presente no sêmen e dessa forma propagar a doença através da inseminação artificial (Heinemann et al. 1999, Givens & Marley 2008).

Neglia et al. (2007) mostrou que búfalas soropositivas para brucelose, quando utilizadas para produção de embriões *in vitro* ao serem fertilizados com sêmen livre de *brucella* spp não apresentou amplificação do DNA bacteriano, sugerindo que animais soropositivos podem ser possíveis doadores na transferência de embriões. No entanto Magajevski (2007) mostrou que pode haver a transmissão de leptospirose e brucelose por meio das técnicas de produção de embriões *in vitro*, caso não sejam tomadas medidas sanitárias adequadas e os devidos cuidados durante a manipulação dos oócitos e dos embriões.

Com relação a saúde pública, deve ser ressaltado a forma em que esses animais são abatidos, já que muitas vezes não existem municípios com abatedouros disponíveis ou adequados para a realização do abate. Com isso os animais são abatidos clandestinamente, sendo potenciais fontes de infecção para o homem (magarefes) bem como para animais que se alimentam dos restos de vísceras que são muitas vezes deixados a céu aberto sem nenhum tratamento. Durante o estudo dois abatedouros foram fechados, no entanto o abate e o consumo de carne não deixaram de existir aumentando ainda mais as chances de contaminação humana.

CONCLUSÕES

Levando em consideração as condições em que o estudo foi realizado, pode-se concluir que a infecção por *Leptospira* em bovinos ocorre no semiárido do Rio Grande do Norte com maior frequência para o sorovar Hardjo durante o período seco do ano.

A brucelose foi detectada, mas com frequência muito baixa.

Não foi detectada a presença de DNA de *Leptospira* spp. e *Brucella* sp. nos ovários e epidídimos dos animais do estudo através da PCR.

AGRADECIMENTOS

A CAPES pelo financiamento da bolsa de estudos, a Zenaide pela realização da sorologia para leptospirose e ao laboratório de bacteriologia aplicada do departamento de medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Minas Gerais pelo apoio na realização da PCR.

REFERÊNCIAS

- Alves, T.M. Participação dos receptores semelhantes ao *Toll* na indução de expressão de mRNA para CXCL8 (IL-8) na infecção *in vitro* de células epiteliais por *Campylobacter fetus* subsp. *Venerealis* e *Tritrichomonas foetus*. Tese de doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Medicina Veterinária, Belo Horizonte, MG.61p.2010.
- Aycardi E, Rivera B., Torres B., De Bohorquez V.1982. Experimental infection with a *Leptospira* hardjo strain isolated from cattle of the eastern plains of Colombia. *Veterinary Microbiology*. 7(6):545-50.
- Baily G.G., Krahn J.B. Drasar B.S., Soker N.G. 1992. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J. Trop. Med. Hyg.* 95, 271-275.
- Bielanski A., Surujballi O., Thomas E.G., Tanaka E. 1998.Sanitary status of oocytes and embryos collected from heifers experimentally exposed to *Leptospira borgpetersenii* serovar *hardjobovis*. *Animal Reproduction Science*. (54): 65-73.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT). 188p, Brasília: MAPA/SDA/DAS, 2006.
- Castro V, Azevedo SS, Gotti TB, Batista CSA, Gentili J, Moraes ZM, Souza GO, Vasconcellos SA, Genovez ME. 2008. Soroprevalência da leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no estado de São Paulo, Brasil.
- Cole Junior J.R., Sulzer C.R. & Pursell A.R. 1973. Improved microtechnique for agglutination test. *Appl. Microbiol.* 25:970-980
- Costa M.C.R., Moreira E.C., Leite R.C., Martins N.R.S. 1998. Avaliação da imunidade cruzada entre *Leptospira hardjo* e *L. wolffi*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*.50(1);11-7. Dissertação mestrado.

- Ellis W.A. Bovine leptospirosis in the tropics: prevalence, pathogenesis and control. 1984. Preventive Veterinary Medicine 2:411-421.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the The United Nations. 2010. Disponível em: faostat.fao.org/site/339/default.aspx. Acesso em 10/04/2012.
- Favero M, Pinheiro SR, Vasconcellos SA, Moraes ZM, Ferreira F, Ferreira Neto JS. 2001. Leptospirose bovina - variantes sorológicas predominantes em colheitas efetuadas no período de 1984 a 1997 em rebanhos de 21 estados do Brasil. Arquivos do Instituto Biológico. jul/dez;68(2):29-35.
- Galton M.M., Sulzer C.R., Santa Rosa C.A. & Fields M.J. 1965. Application of a microtechnique to the agglutination test for leptospiral antibodies. Appl. Microbiol. 13:81-85.
- Givens A.D. & Marley M.S.D. 2008. Pathogens that cause infertility of bulls or transmission via semen. Theriogenology. 70:504-07.
- Gonçalves A.T., Paiva C., Melo-Mota F., Vieira M.L., Carreira T., Nunes M.S., Mota-Vieira L., Ahmed A., Harstkeerl R.A., Hyde K., Collares-Pereira M. 2010. First isolation of human leptospira strains, Azores, Portugal. International Journal of Infectious Diseases. 14:148-153.
- Grooms DL. 2006. Reproductive losses caused by bovine viral diarrhea virus and leptospirosis. Theriogenology. 66: 624-628.
- Hamdy M.E.R., Amin A.S. 2002. Detection of Brucella Species in the Milk of Infected Cattle, Sheep, Goats and Camels by PCR. The Veterinary Journal. 163(3):299-305.
- Heinemann M.B., Garcia J.F., Nunes C.M., Gregori F., Higa Z.M.M., Vasconcellos S.A., et al. 2000. Detection and differentiation of Leptospira spp. serovars in bovine semen by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. Veterinary Microbiology. 11:73(4):261-7.
- Heinemann M.B., Garcia J.F., Nunes C.M., Moraes Z.M., Gregori F., Cortez A., Vasconcellos S.A., Visintin J.A., e Richtzenhain L.J. 1999. Detection of Leptospire in Bovine Semen by Polymerase Chain Reaction. Australian Veterinary Journal. 77(1): 32-34.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2010. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=2002&id_pagina=1. Acessado: 26/07/2012.
- IDEMA RN. Instituto de Desenvolvimento Sustentável e Meio Ambiente do Rio Grande do Norte. Anuário Estatístico,. 2010. Caracterização do Território, recursos naturais e meio ambiente. Disponível em: http://www.idema.rn.gov.br/contentproducao/aplicacao/idema/socio_economicos/arquivos/Anuario-CDROM%202010/index.htm.
- Juliano R.S., Chaves N.S.T., Santos C.A., Ramos L.S., dos Santos H.Q., Meireles L.R., Gottschalk S, Corrêa Filho R.A.C. 2000. Prevalence and epidemiology aspects of bovine leptospirosis in dairy herd from Goiânia microregion, Goiás state, Brazil. Ciência Rural; 30(5):857-62.
- Junqueira, J.R.C, Freitas J.C., Alfieri A.F., Alfieri A.A. 2006. Avaliação do desempenho reprodutivo de um rebanho bovino de corte naturalmente infectado com o BoHV-1, BVDV e *Leptospira hardjo*. Ciências agrárias. 27(3):471-480.
- Magajevski F.S & Girio R.J.S. 2008. Avaliação da sensibilidade da pcr frente a quatro técnicas para extração de dna de *leptospira interrogans* sorovar pomona em sêmen bovino experimentalmente contaminado. Ars Veterinaria, Jaboticabal, SP. 24(1): 29-33.
- Magajevski F.S., Girio R.J.S., Mathias L.A., Myashiro S., Genovez M.É., Scarcelli E.P. 2005. Detection of Leptospira spp. in the semen and urine of bulls serologically reactive to Leptospira interrogans serovar hardjo. Brazilian Journal of Microbiology. 36(1):43-5.
- Magajevski, F.S. 2007. 83p. *Leptospira* spp. e *Brucella* spp. em fetos e oócitos colhidos de vacas no momento do abate. Tese de doutorado, Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade estadual Paulista. Jaboticabal, SP.
- Mérien F., Amouriaux P., Perolat P., Baranton G., Girons I.S. 1992. Polimerase chain reaction for detection of Leptospiras spp in clinical samples. J. Clin. Microbiol. 30(9):2219-2224.
- Mesquita M., Pellegrini D.C.P., Simões Pires Neto J.A., Reis G.R., Medeiros C., Corbellini L.G. 2010. Análise de série temporal para avaliação do perfil sorológico da leptospirose bovina no Estado do Rio Grande do Sul de 1996 a 2006. Arquivos do Instituto Biológico. 77(3):381-387.
- Mineiro A.L.B.B., Bezerra E.E.A., Vasconcellos A.S., Costa F.A.L., Macedo N.A. 2007. Infecção por leptospira em bovinos e sua associação com transtornos reprodutivos e condições climáticas. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 59(5):1103-1109.
- Mineiro A.L.B.B., Vieira R.J., Costa E.A., Santos R.L., Gonçalves L.M.F., Carvalho S.M., Bomfim M.R.Q., Costa F.A.L. 2011. Serology, polymerase chain reaction and histopathology for leptospirosis in

- samples collected at slaughter from dairy cows of Parnaíba region, state of Piauí, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 31(10):859-66.
- Neglia G., Zicarelli L., Di Palo R., Picillo E., Attanasio L., Boccia L., et al. 2007. *Brucella* DNA is not detected in in-vitro produced embryos derived from ovaries of naturally infected buffaloes. *Italian Journal of Animal Science* [Internet]. 4 ;6(2s): 900-3. disponível em: <http://www.aspajournal.it/index.php/ijas/article/view/1142>.
- Oliveira C.S., Azevedo S.S., Pinheiro S.R., Batista A.S., Moraes Z.M., Souza G.O., Gonçalves A.P., Vasconcellos A.S. 2010. Fatores de risco para a leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no Estado da Bahia, Nordeste do Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 30(5):398-402.
- Poester F., Figueiredo V.C.F., Lôbo J.R., Gonçalves V.S.P., Lage A.P., Roxo E., et al. 2009. Estudos de prevalência da brucelose bovina no âmbito do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose: Introdução. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 61:01-05.
- Richtzenhain L.J., Cortez A., Heinemann M.B., Soares R.M., Sakamoto S.M., Vasconcellos S.A., Higa Z.M.M., Scarcelli E., Genovez M.E. 2002. A multiplex PCR for the detection of *Brucella* spp. and *Leptospira* spp. DNA from aborted bovine fetuses. *Veterinary Microbiology*. 87:139-47.
- Romero C., Lopez-Goñi I. 1999. Improved Method for Purification of Bacterial DNA from Bovine Milk for Detection of *Brucella* spp. by PCR. *Appl Environ Microbiol*. 65(8):3735-3737.
- Shimabukuro F.H.. Avaliação sorológica e detecção molecular de leptospirosas em tecidos de camundongos experimentalmente infectados com estirpes patogênicas de *Leptospira interrogans* sorovar pomona e canicola. 2007. 100p. Tese de doutorado – Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.
- Souza C.H., Araújo K.S.M., Silva J.A. 2009. Ocorrência de brucelose bovina na região do Vale do Açu no Estado do Rio Grande do Norte. *Anais do Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária*. Porto Seguro – BA.
- Tocantins S. Distribuição espacial da prevalência de aglutininas anti-leptospira em bovinos em Cáceres, MT, Brasil. 2007. 81p. Tese de doutorado – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.

Legenda das Figuras

Figura 1- Porcentagem de bovinos soro reagentes para *Leptospira* sp, provenientes dos abatedouros públicos do estado do Rio Grande do Norte, distribuídos por faixa etária

Figura 2- Bovinos abatidos em matadouros públicos no Rio Grande do Norte, no período de dezembro/2010 a agosto/2011. Classificados por sexo e faixa etária

Figura 3- Prevalência dos sorovares (exceto Hardjo) de bovinos abatidos em abatedouros públicos do Estado do Rio Grande do Norte, nos dois períodos estudados (seco e chuva)

Figura 4- Prevalência apenas para o sorovar Hardjo, no dois períodos estudados (seca e chuva), de bovinos abatidos em matadouros públicos do Estado do Rio Grande do Norte.

Figura 5- Gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio (0,5 para o sorovar Hardjobovis. Canaletas: 1 e 18 (marcador de peso molecular 1Kb Plus -Invitrogen®), 2-3 (10 e 1 ng/μL), 4-6 (100, 10 e 1 pg/ μL), 7-9 (100, 10 e 1 fg/ μL), 10-11(10 e 1 ng), 12-14 (100, 10 e 1 pg), 15-17 (100, 10 e 1 fg).

Figura 6- Resultado do teste de sensibilidade analítica, para *Brucella* spp. Canaletas: 1-2 (10 e 1 ng), 3-5 (100, 10 e 1 pg/ μL), 6-8 (100, 10 e 1 fg/μL), 9 -10(10 e 1 ng/ μL), 11-13 (100, 10 e 1 pg), 14-16 (100, 10 e 1 fg), 17 (marcador de peso molecular 1Kb Plus -Invitrogen®).

Figura 7- Gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídeo (0,5 mg/mL), mostrando o resultado da amplificação da PCR para *Leptospira* spp., *Brucella* spp. e GAPDH em amostras de ovários e epidídimos de bovinos de abatedouros públicos de do Estado do Rio Grande do Norte. PCR para *Leptospira* spp. (canaletas 2-5) nas amostras de ovário (canaletas 2-3) e epidídimo (canaletas 4-5); Para *Brucella* spp. (canaletas 6-9) em ovário (Canaletas 6-7) e epidídimo (Canaletas 8-9); para o GAPDH (canaletas 10-13) em amostras de ovário (canaletas 10-11) e epidídimo (canaletas 12-13). Controle positivo *Leptospira* sorovares Hardjobovis (canaleta 14) e *Icterohaemorrhagiae* (canaleta

15). Controles positivos *Brucella abortus* amostra de referência 870, Tulya e 544 (canaletas 16, 17 e 18 respectivamente). Controles negativos (canaletas 19, 20 e 21). Canaleta 1 - Marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen, EUA).

Quadros

Quadro1. Etapas da amplificação do DNA para a Reação em Cadeia pela Polimerase para pesquisa de *Leptospira*, *Brucella* e GAPDH

ETAPAS DA PCR	PCR/ <i>Leptospira</i> ^a	PCR/ <i>Brucella</i> ^b	PCR/ GAPDH
Desnaturação inicial	94°C por 3min	94°C por 5 min	94°C por 5 min
Número de Ciclos	30	40	40
Desnaturação do DNA	94°C por 30seg	94°C por 60seg	94°C por 60seg
Analamento (<i>Primers</i>)	63°C por 45seg	60°C por 60seg	60°C por 60seg
Extensão do DNA	72°C por 30seg	71°C por 60seg	71°C por 60seg
Extensão Final	72°C por 10min	72°C por 10min	72°C por 10min

^aMérien et al. (1992), com modificações

^b(Baily et al. 1992).

Quadro 2- Frequência relativa por sorovar nas 189 amostras positivas para *Leptospira* spp. de um total de 306 soros bovinos testados na soroaglutinação microscópica, de abatedouros públicos do Estado do Rio Grande do Norte

VARIANTE SOROLÓGICA	POSITIVOS	Frequência Relativa (%)*
Hardjo		
Hardjoprajitno	28	14,8
Hardjobovis	19	10,1
Wolffi	28	14,8
Butembo	13	6,9
Icterohaemorrhagiae	13	6,9
Hebdomadis	5	2,6
Australis	3	1,6
Pomona	2	1,1
Grippotyphosa	2	1,1
Patoc	2	1,1
Canicola	1	0,5
Autumnalis	1	0,5
Sentot	1	0,5

*Frequência relativa obtida pela divisão do número de positivos de cada sorovar pelo total de positivos para *Leptospira* spp. (189).

Quadro 3- Distribuição de acordo com a faixa etária, dos bovinos positivos e negativos para *Leptospira* spp., provenientes dos abatedouros públicos do estado do Rio Grande do Norte, distribuídos por faixa etária

Faixa etária (meses)	Bovinos Positivos	%	Bovinos Negativos	%	TOTAL
12 – 24	13	76,47	4	23,53	17
25 – 36	73	64,60	40	35,40	113
> 36	103	58,52	73	41,48	176
TOTAL	189		117		306

Quadro 4- Distribuição de acordo com a categoria (idade em meses) e do título de anticorpos dos animais avaliados apresentados na prova de soroaglutinação microscópica, em bovinos abatidos em abatedouros públicos do Estado do Rio Grande do Norte.

abastecidos em abatedouros públicos do Estado do Rio Grande do Norte.				
INFECÇÃO/ ANIMAL POSITIVO	Idade em meses			TOTAL (%) (n=306)
	13-24 (%) (n=17)	25 – 35 (%) (n=113)	≥36 s (%) (n=176)	
LEPTOSPIROSE				
Diluição: até 1:400	11 (64,7)	51 (45,1)	73 (41,5)	135 (44,1)
Diluição: ≥1:800	2 (11,8)	22 (19,5)	30 (17,0)	54 (17,6)
Sub- total	13 (76,5)	73 (64,6)	103 (58,5)	189 (61,8)

Quadro 5. Prevalência dos sorovares Hardjo, Wolffi, Butembo, Icterohaemorrhagiae, Hebdomadis, Australis, Pomona, Grippotyphosa, Patoc, Canicola, Autumnalis e Sentot de acordo com os títulos apresentados no teste de SAM.

SOROVAR	TÍTULOS												TOTAL		
	100		200		400		800		1600		3200				
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	% ^a	% ^b
Hardjo															
Hardjoprajitno	0	0	8	6,78	9	7,63	9	7,63	0	0	2	1,69	28	9,15	23,73
Hardjobovis	4	3,39	3	2,54	6	5,08	3	2,54	3	2,54	0	0	19	6,21	16,10
Wolffi	0	0	5	4,24	9	7,63	8	6,78	1	0,85	5	4,24	28	9,15	23,73
Butembo	8	6,78	4	3,39	1	0,85	0	0	0	0	0	0	13	4,25	11,02
Icterohaemorrhagiae	10	8,47	3	2,54	0	0	0	0	0	0	0	0	13	4,25	11,02
Hebdomadis	3	2,54	0	0	2	1,69	0	0	0	0	0	0	5	1,63	4,24
Australis	2	1,69	1	0,85	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0,98	2,54
Pomona	1	0,85	1	0,85	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0,65	1,69
Grippotyphosa	0	0	0	0	1	0,85	0	0	0	0	1	0,85	2	0,65	1,69
Patoc	0	0	1	0,85	1	0,85	0	0	0	0	0	0	2	0,65	1,69
Canicola	0	0	1	0,85	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,33	0,85
Autumnalis	1	0,85	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,33	0,85
Sentot	1	0,85	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,33	0,85
Total geral	30	25,42	27	22,88	29	24,58	20	16,95	4,00	3,39	8	6,78	118,00	38,56	100,00

^a: em relação ao total de animais examinados (306)

^b: em relação ao total de animais sororreagentes a apenas um sorovar (118)

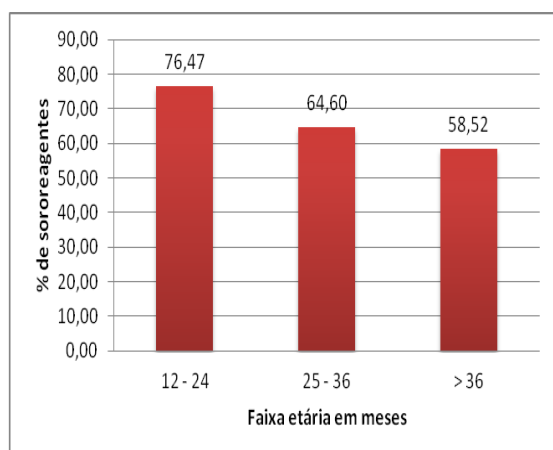


Figura 1

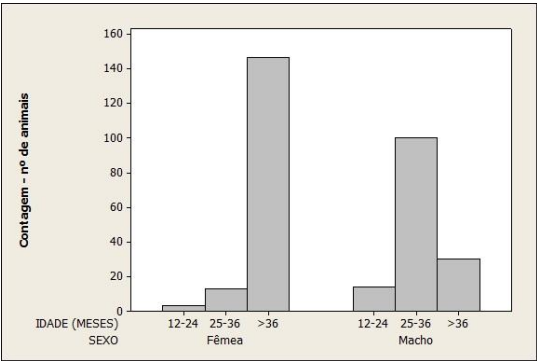


Figura 2

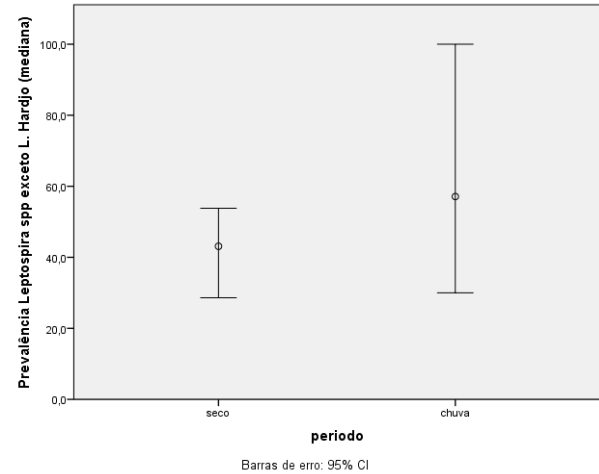


Figura 3

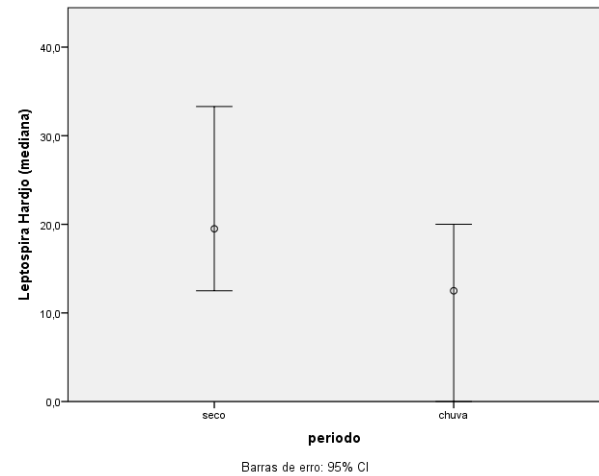


Figura 4

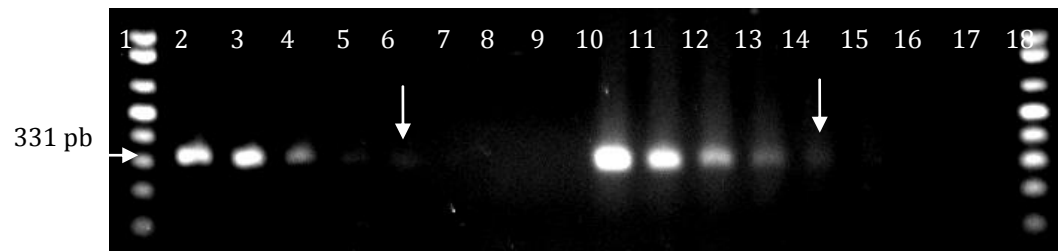


Figura 5

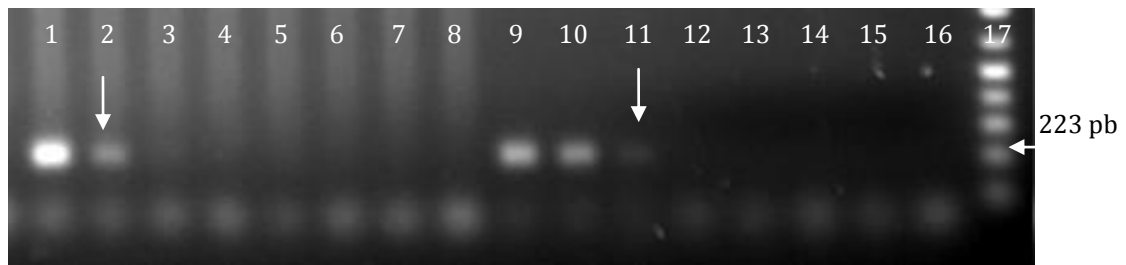


Figura 6

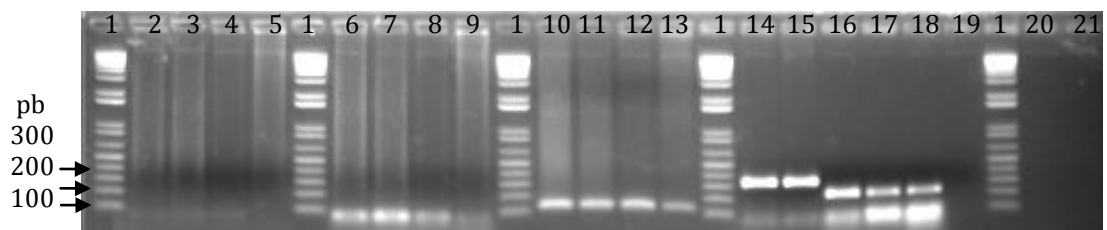


Figura 7

ANEXO III - Protocolo padrão para tecido animal - Kit Promega ReliaPrep™ gDNA tissue Miniprep Systems®

1. Pesar 25 mg de amostra.
2. Adicionar 160µl de PBS a cada amostra a ser processada e passar no vortex.
3. Adicionar 20 µl de solução de proteinase K (PK) para a amostra homogeneizada. Adicionar 200µl de Tampão de Lise celular (CLD) para o tubo. Tampar e misturar no vortex durante pelo menos 10 segundos.
4. Incubar a 56 ° C durante 40 minutos – (Termobloco)
Se as amostras forem difíceis de lisar ou não foram completamente homogeneizados, uma tempo de incubação maior pode ser necessário.
5. Adicionar 20 µL da solução de RNase A para cada amostra , misture em vórtex por 10 segundos, e colocar na microcentrífuga a 56 ° C durante 10 minutos. Remover o tubo do termobloco. Adicionar ao tubo 250µl de tampão de ligação (BBA), e agitar em vórtice durante 10 segundos.

Nota: Se grandes quantidades de tecido intacto ainda são visíveis no tubo, por o tubo na microcentrífuga durante 1 minuto para que o pellet se dissolva.

6. Colocar uma coluna TM ReliaPrep Binding dentro de um tubo para cada amostra. Transferir a porção do líquido da amostra para a coluna de ligação, tampá-lo, e colocá-lo em uma microcentrífuga.
7. Centrifugar durante 1 minuto à velocidade máxima.

Verificar a coluna de ligação para certificar-se que o lisado passou completamente através da membrana. Se o lisado ainda é visível na parte superior da membrana, centrifugar a coluna por mais um minuto.

8. Remover o tubo de coleta, e descartá-lo junto com o líquido.
9. Colocar a coluna de ligação em um novo tubo de coleta.
10. Adicionar 500µl da Solução de lavagem (CWD) para a coluna, e centrifugar durante 2 minutos a velocidade máxima. Remover o tubo de coleta e descartá-lo junto com o líquido.

Se alguma solução de lavagem permanece na membrana, centrifugar por mais um minuto.

11. Repetir o passo 12 duas vezes para um total de 3 lavagens.
12. Colocar a coluna em um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml limpos.
13. Adicionar 50 µl de água livre de nuclease (nuclease-free water) à coluna.

14. Centrifugar por 1 minuto em velocidade máxima (14.500) rpm.
15. Descartar a Coluna TM ReliaPrep Binding, e guardar o eluido.
16. Não reutilizar colunas de ligação ou tubos de coleta. O DNA genómico pode ser colocado à 4° C para armazenamento de curto prazo ou -20 ° C para armazenamento a longo prazo.