

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

DISSERTAÇÃO

**Influência da Leptospirose sobre a produção e reprodução no rebanho leiteiro
do Campus Nilo Peçanha- IFRJ-Pinheiral, Estado do Rio de Janeiro**

Adriane Garcia da Rosa

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**Influência da Leptospirose sobre a produção e reprodução no rebanho
leiteiro do Campus Nilo Peçanha- IFRJ-Pinheiral, Estado do Rio de
Janeiro**

ADRIANE GARCIA DA ROSA

Sob a Orientação da Professora
Vera Lúcia Teixeira de Jesus

Dissertação submetida como
requisito parcial para obtenção do
grau de **Mestre em Ciências** em
Medicina Veterinária.

Seropédica, RJ

Fevereiro, 2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINARIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

ADRIANE GARCIA DA ROSA

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** em Medicina Veterinária.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM:-.26/.02./2013.

Vera Lúcia Teixeira de Jesus Dra. UFRRJ
(Orientadora)

Janaína Barcelos Porto Ferreira Dra. FIOCRUZ

Walter Flausino PhD UFRRJ

Como é Grande o Meu Amor Por Você

*Eu tenho tanto pra lhe falar
Mas com palavras não sei dizer
Como é grande o meu amor por você*

*E não há nada pra comparar
Para poder lhe explicar
Como é grande o meu amor por você*

*Nem mesmo o céu nem as estrelas
Nem mesmo o mar e o infinito
Não é maior que o meu amor
Nem mais bonito*

*Me desespero a procurar
Alguma forma de lhe falar
Como é grande o meu amor por você.*

Roberto Carlos

Dedico essa musica ao meu saudoso pai Francisco (in memoriam) por ter sido um grande homem, dedicado, honesto, trabalhador, líder sindical, marido, pai, avô e bisavô. O senhor estará sempre em nossos corações..até mais pai, pois não tenho palavras sua benção!

Dedico este trabalho:

Aos meu pais, irmãos e amigos por todo carinho e incentivo;

Ao meu marido pelo companherismo;

A minha filha pelo carinho;

A minha orientadora Vera Lucia Teixeira de Jesus, pela oportunidade oferecida e pela sua amizade.

“ O simples fato de achar que nada mais tem a aprender, por si só já demonstra a grandeza da ignorância de quem assim pensa. Não existe ninguém que saiba tão pouco que não tenha nada a ensinar, ou que saiba tanto que não tenha algo a aprender.

(Dicker, P.)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS por estar aqui, concluindo esta etapa, com saúde, fé e perseverança.

Aos meus pais Francisco e Sara por minha formação, pelo carinho e apoio em todos os momentos;

Aos meus irmãos Francisco José, Roberto e Márcia pelo incentivo;

Ao meu marido Marlon pelo companheirismo e incentivos incessantes;

A minha filha Maria Luíza que com seu carinho, me fez superar e continuar, é a minha “pequenina” por ser meu maior motivo de alegria da minha vida;

A Sôzinha que me ajudou, amparou e incentivou nos momentos mais difíceis;

A minha orientadora Professora Vera Lucia Teixeira de Jesus, pelo exemplo de profissionalismo e por ter me acolhido com amizade, proporcionando a oportunidade de aprender com seus ensinamentos e realizar este trabalho;

Aos professores José Eugênio Três e Walter Flausino pela ajuda e colaboração para realizar este trabalho;

As colegas de faculdade Caroleni, Gisele e Carol, pela colaboração ao trabalho;

Aos funcionários da Bovinocultura de leite do IFRJ- Campus Nilo Peçanha Pinheiral-RJ, seu Francisco, Pingo e Leandro, pelo carinho e colaboração para realizar este trabalho;

Ao Professor Luis Roberto de Souza e ao técnico responsável pela bovinocultura de leite Edson Luis, pela ajuda e colaboração;

Ao Coordenador de Produção do IFRJ, Marlon Sarubi da Silva, pelo apoio, incentivo e cooperação durante a realização deste trabalho;

Ao Diretor do IFRJ- Campus Nilo Peçanha Carlos Eduardo Gabriel Menezes pela autorização e colaboração para realizar este trabalho;

A UFRRJ por ter me acolhido tão bem após alguns anos de ausência;

Pela CAPES(REUNI) em ter me contemplado com a minha bolsa, á qual foi de grande ajuda para que eu pudesse me manter financeiramente e realizar o meu trabalho;

A Coordenação e aos os professores do Programa de Pós-Graduação de Medicina Veterinária, que contribuíram para a minha formação profissional;

Muito Obrigada!

RESUMO

ROSA, Adriane Garcia da, **Influência da Leptospirose sobre a produção e reprodução no rebanho leiteiro do Campus Nilo Peçanha- IFRJ-Pinheiral, Estado do Rio de Janeiro**, Seropédica: UFRRJ, 2013. 52p. (Dissertação, Mestrado em Medicina Veterinária).

O objetivo deste estudo foi associar às falhas reprodutivas e produção leiteira do rebanho com a presença de animais reagentes a leptospirose. Para tal foram caracterizadas as variáveis pertinentes ao animal e ao manejo, relacionando dados produtivos e reprodutivos com os resultados sorológicos para leptospirose. Foram utilizadas 49 vacas girolanda em lactação, criadas em um sistema semi-extensivo de várzea úmida, distribuídos em piquetes, cuja alimentação composta por volumoso, com complementação de concentrado e a mineralização *ad libitum*, provenientes do rebanho leiteiro do Campus de Pinheiral. Foram coletadas três amostras de soro sanguíneo de todo o rebanho e encaminhadas ao Instituto Biológico de São Paulo, para a realização da técnica de Soro-aglutinação Microscópica, com intervalo de quatro meses, entre coletas, durante o período de junho de 2011 a dezembro de 2012. Visando o acompanhamento da produção e reprodução, estas fêmeas foram avaliadas pelo exame ginecológico e histórico reprodutivo, obtidos através da análise das fichas individuais, em paralelo à produção individual de leite foram computados os dados em planilhas de Excell, e confrontando os dados com os resultados sorológicos para leptospirose. Observou-se que na primeira coleta (06/2011) foi de 52,17%, na segunda coleta em 03/12 (50,0%) e na terceira coleta em 06/12 (42,85%). O sorovar de maior prevalência foi Hardjo (20,66%), seguido de Wolffi (19,00%), e estes não diferiram pelo teste do qui-quadrado. Quando todas as variáveis foram associadas, concluiu-se que mesmo com sorologia positiva para o sorovar hardjo, quando comparado com a produção e reprodução do rebanho, não diferiu o grupo reagente e negativo, visto que o escore corporal deste rebanho mantevesse entre 3,5 a 4,0, o que garante uma boa eficiência reprodutiva do rebanho.

Palavras chave: *Leptospira interrogans*, sorovar hardjo, infertilidade, fatores risco

ABSTRACT

ROSA, Adriane Garcia, **Influence of leptospirosis on production and reproduction in dairy herd Campus Nilo Peçanha-IFRJ-Pinheiral, State of Rio de Janeiro**, Seropédica: UFRRJ, 2013. 52 p. (Dissertation, Master's Degree in Veterinary Medicine).

The aim of this study was to associate the dairy herd reproductive failure in the presence of animals reagents leptospirosis. To this end we characterized the relevant variables to the animal and the management, production and reproductive performance data relating to the serological results for leptospirosis. A total of 40 cows in lactation Girolanda, created in a semi-extensive system of lowland, over paddocks, whose diet consists of forage, supplementation with concentrate ad libitum and mineralization in pasture, dairy cattle from the Campus of the Technical College Pinheiral were collected three samples of blood serum of the whole flock and sent to the Biological Institute of São Paulo, to the technique of serum-Microscopic agglutination with an interval of four months between collections during the period from 2011 to 2012. Aiming to monitor the production and reproduction, these females were evaluated by gynecological and reproductive history, obtained through analysis of individual records, in parallel with individual milk production were computed data in Excel spreadsheets, and comparing the data with the results of serological leptospirose. Observou to that in the first collection (June/2011) was 52.17%, the second collection in March 2012 (50.0%) and the third collection in June 2012 (42.85%). The higher prevalence of serovar was Hardjo (20.66%), followed by Wolffi (19.00%) did not differ quando analyzed by chi-square at 5%. When all variables were associated, it was concluded that even with positive serology for serovar hardjo compared to the production and reproduction of the herd, the group did not differ regante and negative, since this herd body condition score between 3.5 mantevesse to 4.0, which ensures good efficiency reprodutiva herd.

Key-words: *Leptospira interrogans*, sorovar hardjo, infertility, risk factors

SUMÁRIO DE TABELAS

Tabela 1	Reservatórios típicos de manutenção para sorovares comuns de <i>Leptospira sp.</i>	5
Tabela 2	Prevalência de anticorpos anti- <i>Leptospira sp</i> em bovinos oriundos de diferentes Estados brasileiros, de 1998 a 2012.	11
Tabela 3	Resultados soro-reagentes a <i>Leptospira interrogans</i> , das 49 vacas leiteiras do rebanho do Campus Pinheiral/ IFRJ, do Estado do Rio de Janeiro, em junho de 2011.	24
Tabela 4	Resultados soro-reagentes a <i>Leptospira interrogans</i> , das 49 vacas leiteiras do rebanho do Campus Pinheiral/ IFRJ, do Estado do Rio de Janeiro, em março de 2012.	25
Tabela 5	Resultados soro-reagentes a <i>Leptospira interrogans</i> , das 49 vacas leiteiras do rebanho do Campus Pinheiral/ IFRJ, do Estado do Rio de Janeiro, em junho de 2012	25
Tabela 6	Resultados do Teste do Qui-quadrado (nível de 5%), dos 49 vacas sororeagentes a <i>Leptospira interrogans</i> no Campus de Pinheiral, Estado do Rio de Janeiro, de junho de 2011 a dezembro de 2012.	24
Tabela 7	Distúrbios reprodutivos do rebanho dos animais sororeagentes a <i>Leptospira interrogans</i> no Campus de Pinheiral, estado do Rio de Janeiro.	28
Tabela 8	Índices reprodutivos no rebanho do Campus de Pinheiral, Estado do Rio de Janeiro, de 2011 a 2012.	29

SUMÁRIO DE FIGURAS

Figura 1	Área da Unidade de Ensino e Produção do IFRJ, Campus Nilo Peçanha, Pinheiral/RJ	17
Figura 2	Curral de ordenha, Unidade de Ensino e Produção do IFRJ, Campus Nilo Peçanha, Pinheiral/RJ	17
Figura 3	Unidade de Ensino e Produção do IFRJ, Campus Nilo Peçanha, Pinheiral/RJ. Conforto Animal	18
Figura 4	Pastos da Unidade de Ensino e Produção Bovinos de Leite – IFRJ- Campius Pinheiral	19

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Características da Leptospirose.....	3
2.2 Etiologia.....	3
2.3 Patogenia e Sinais Clínicos.....	5
2.4 Leptospirose Bovina.....	6
2.5 Prevalência da Leptospirose no Brasil.....	9
2.6 Diagnóstico da Leptospirose.....	11
2.6.1 Métodos diretos.....	11
2.6.2 Métodos Indiretos.....	13
2.7 Epidemiologia.....	13
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 Local de Execução.....	16
.....	18
3.3 Materiais utilizados e o local de execução dos exames e análise.....	20
3.4 Sorodiagnóstico para Leptospirose bovina.....	20
3.5 Técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM).....	20
3.6 Antígenos.....	21
3.7 Titulação.....	21
3.8 Cálculo de Índices de Produtividade.....	22
3.9 Cálculo dos Índices Reprodutivos.....	22
3.10 Análise dos fatores de risco.....	23
3.11 Análise Estatística.....	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
4.1 Resultados Sorológicos da SAM.....	24
4.2 Cálculo dos Índices de Produtividade.....	27

4.3 Calculos dos Indices Reprodutivos.....	27
4.4 Análise dos Fatores de Risco.....	29
5 CONCLUSÃO.....	31
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32

1. INTRODUÇÃO

Para obter padrões ideais de eficiência reprodutiva, ou seja, a produção de uma cria/ano, com intervalo de parto de 12 a 12,5 meses e período de lactação de 10 meses, é preciso que ocorra perfeita interação dos parâmetros genéticos, reprodutivos, sanitários e nutricionais. Neste sentido, faz-se necessário a análise da performance reprodutiva animal, estabelecendo-se e avaliando-se parâmetros e índices reprodutivos, para que se possa identificar, definir metas, monitorar e solucionar os fatores que estão comprometendo a eficiência reprodutiva.

Vários fatores podem interferir nas taxas de reprodução dos rebanhos de bovinos, destacando-se aqueles relacionados à fisiopatologia, à genética, à nutrição e ao manejo zootécnico-sanitário dos rebanhos. Neste particular as doenças infecciosas que direta ou indiretamente comprometem o trato reprodutivo da fêmea, do macho, do embrião e do feto.

As doenças reprodutivas são responsáveis por enormes prejuízos econômicos aos produtores de gado de corte ou de leite. Os prejuízos causados por essas doenças se deve ao aumento do intervalo entre partos, ou seja, a fêmea deixa de produzir um terneiro por ano, e quanto mais essa fêmea demorar para emprenhar após o parto, maior é o intervalo entre partos e maiores são os prejuízos. Pode-se notar que os sintomas das doenças reprodutivas são basicamente os mesmos, repetição de cio, morte embrionária, mumificação fetal, abortamento e nascimento de terneiros fracos e inviáveis. Assim pela simples observação dos sintomas é impossível determinar qual das doenças está afetando o rebanho, somente por exame laboratorial podemos determinar qual doença é responsável pelos prejuízos.

Entre as doenças que atingem a esfera reprodutiva, a leptospirose tem sido uma doença preocupante tanto para animais quanto para seres humanos; tratando-se de uma zoonose de grande importância na saúde pública e uma doença causadora de transtornos reprodutivos nos bovinos, gerando impactos negativos na eficiência de rebanhos bovinos de todo o planeta. No Brasil, por se tratar de uma doença endêmica, a doença assume grande importância na pecuária bovina, sendo encontradas diversas sorovares infectantes com prevalências elevadas.

Embora em outros países seja bem conhecida o impacto da leptospirose na esfera reprodutiva, não há muitos estudos da quantificação das perdas para as cadeias produtivas da carne e leite, mas

há relatos que comprovam que o manejo do rebanho tem impacto significativo não só sobre a prevalência mas também sobre a distribuição dos sorovares no rebanho e na pastagem. O objetivo deste trabalho, foi de associar os animais sororeativos a leptospirose com as falhas reprodutivas e perdas da produção de leite, bem como a interferência das condições climáticas, no rebanho leiteiro do IFRJ/Pinheiral.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características da Leptospirose

A leptospirose é uma doença ou infecção natural, transmissível entre os animais vertebrados e o homem (COLEMAN, 2000), de curso agudo a crônico que afeta diversas espécies de animais domésticos, silvestres e os seres humanos, que assume considerável importância como problema econômico e de saúde pública, devido alta morbidade e a manutenção do agente na natureza ocorre devido aos portadores domésticos e silvestres (FAINE, 1999, BRASIL, 1995).

Essa zoonose está mundialmente distribuída, mas sua ocorrência é maior em países de clima tropical e subtropical devido principalmente à maior sobrevivência das leptospirosas em ambientes quentes e úmidos. A doença é sazonal, com picos epidêmicos no verão e outono em regiões de clima temperado ou durante as estações de chuva nas regiões quentes (BRASIL, 2007).

2.2 Etiologia

As leptospirosas pertencem à ordem *Spirochaetales*, a qual faz parte de um filo bacteriano único, *Spirochaetes*, junto com o *Treponema pallidum* e a *Borrelia burgdorferi*, agentes da sífilis e da doença de Lyme, respectivamente, entre outros. A família *Leptospiraceae* compreende o gênero *Leptospira*, o qual é composto por bactérias helicoidais de 6 a 20 μm de comprimento e 0,1 μm de diâmetro, aeróbias e móveis, com gancho característico terminal em uma ou ambas as extremidades. Sob condições adversas podem ser alongadas; em alta concentração de sal, em tecidos ou culturas recentes podem ter uma forma cocóide. Sua divisão é por fissão binária e são aeróbias obrigatórias com ótimo crescimento a 28 a 30°C, possuem multiplicação e crescimento lentos e são exigentes no que se refere a meios nutritivos, e o seu tempo de geração está situado em torno de sete a 12 horas (FAINE, 1999). O período de sobrevivência das leptospirosas patogênicas na água varia segundo a temperatura, o pH e o grau de poluição. Todas as leptospirosas são sensíveis ao pH ácido de 6,8 ou menos, porém sua multiplicação é ótima em pH levemente alcalino compreendido entre 7,2 e 7,4 (ELLIS, 1994; FAINE et al., 2000).

A classificação sorológica das leptospirosas adota critérios relacionados a reações sorológicas que fornecem os sorogrupos de leptospirosas patogênicas e saprófitas (QUIIN et al., 1994). Na reunião de 2007 da Subcomissão sobre a Taxonomia de Leptospiraceae realizada em Quito, Equador, foi decidido dar o status de espécies ao anteriormente descrito genospecies 1, 3, 4 e 5, resultando em uma família com 13 espécies patogênicas de *Leptospira*: *L. alexanderi*, *L. alstonii* (genospecies 1), *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. fainei*, *L. Kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. terpstrae* (3 genospecies), *L. weilii*, *L. wolffii*, com mais de 260 serovares. As espécies saprófitas de *Leptospira* incluem *L. biflexa* L., *L. meyeri*, *L. yanagawae* (genospecies 5), *L. kmetyi*, *L. Vanthielii* (genospecies 4), e *L. wolbachii*, e contêm mais de 60 sorotipos. Estes sorovares são classificados de acordo com os epítomos em um mosaico de lipopolissacarídeo (LPS) de antígenos, enquanto sua especificidade depende da composição e orientação do açúcar na sua estrutura.

No Brasil, a leptospirose foi reconhecida pela primeira vez no Pará, por McDOWEL em 1917. No mesmo ano, Aragão verificou a presença de *Leptospira icterohaemorrhagiae* ao estudar seis *Rattus norvegicus* da cidade do Rio de Janeiro. Magaldi (1963), publicou um estudo de incidência, prevalência e distribuição da *Leptospira* spp. no Brasil, sendo o primeiro pesquisador a alertar para a susceptibilidade que o país apresenta para a proliferação da enfermidade. No ano de 1970, Santa Rosa e colaboradores publicaram a experiência de nove anos de estudos sobre leptospirose no Instituto Biológico de São Paulo. Nesse período, foram examinados 21.263 soros humanos e de animais, sendo 15.080 soros de bovinos, onde houve a predominância do sorovar *wolffi*, encontrando uma prevalência de 23,6% (JOUGLARD, 2005).

Apesar da sua importância, a leptospirose bovina não é de notificação compulsória no Brasil e nem submetida ao controle organizado pelos órgãos e entidades públicas ou privadas de sanidade animal (ARAÚJO et al., 2005). Em contrapartida, tanto a ocorrência de casos isolados suspeitos e surtos de leptospirose humana devem ser notificadas ao Ministério da Saúde, de forma rápida, para o desencadeamento das ações de vigilância epidemiológica (BRASIL, 1995). As leptospiroses fazem parte da lista B da Office International des Epizooties (OIE) de doenças a serem observadas no comércio internacional de animais e seus produtos. Segundo a OIE, ainda não se dispõe de um método de diagnóstico considerado ótimo para a determinação do *status* de saúde dos animais. Por essa razão, o teste de aglutinação microscópica ainda é recomendado como a melhor alternativa de diagnóstico das leptospiroses (OIE, 2012).

Alguns sorovares de leptospira são comumente associados com reservatórios animais em particular, como apresentado na Tabela 1 (BHARTI et al., 2003).

Tabela 1 Reservatórios típicos de manutenção para sorovares comuns de *Leptospira* sp.

Hospedeiro de manutenção	Sorovar (es)
Suínos	Pomona, Tarassovi, Bratislava
Bovinos	Hardjobovis, Pomona
Eqüinos	Bratislava
Caninos	Canicola
Ovinos	Hardjobovis
Ratos	Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Ballum
Morcegos	Cynopteri, wolffi

2.3 Patogenia e Sinais Clínicos

A patogenia da leptospira inclui a penetração ativa dos microrganismos pelas mucosas, pele escarificada e mesmo íntegra. Ocorre a sua multiplicação nos espaço intersticiais e nos humores orgânicos (sangue, linfa e líquido), caracterizando um quadro agudo septicêmico denominado leptospiremia (MYERS, 1985). As lesões primárias são atribuídas à ação mecânica do microrganismo nas células endoteliais de revestimento vascular. A consequência direta das lesões dos pequenos vasos é o derrame sanguíneo para os tecidos (hemorragias), a formação de trombos e o bloqueio do aporte sanguíneo nas áreas acometidas na fase aguda da infecção (BRASIL, 1995).

A leptospirose é uma doença sistêmica dos seres humanos e animais domésticos, principalmente cães, bovinos e suínos, caracterizada por febre, insuficiência renal e hepática, manifestações pulmonares e insuficiência reprodutiva. Os sinais clínicos são bastante variáveis, a maioria dos casos são, provavelmente, inaparentes e associados com portadores assintomáticos (ELLIS, 1994).

Sinais de leptospirose incluem falha reprodutiva, abortamento, natimortos, mumificação fetal, leitões ou bezerros fracos e agalaxia (ELLIS, 1994). Uma manifestação crônica da leptospirose é comumente visto em cavalos, como uveíte recorrente (BRAGA et al., 2011), mas não é exclusivo para esta espécie e também pode ser observado ocasionalmente em seres humanos. Os animais que recuperam da leptospirose podem se tornar portadores assintomáticos abrigoando o microrganismo nos túbulos renais por longos períodos e ocasionar a eliminação da leptospira no meio ambiente (LEVETT, 2001). Outras espécies, como camundongos (*Mus musculus* e outras espécies *Mus*) e ratos (principalmente *Rattus norvegicus* e *Rattus rattus*) são reservatórios para diferentes sorovares e hospedeiros (BHARTI et al., 2003). Normalmente não mostram sinais clínicos, mas portam leptospiros nos rins, tornando-se uma importante fonte de infecção para seres humanos ou outros animais (ELLIS, 1984).

A insuficiência renal ou distúrbios renais são os resultados dos danos associados à colonização, e replicação dos organismos nas células do epitélio renal, fase denominada de leptospirúria, na qual o

animal portador elimina a leptospira de dias a anos. Prejuízo agudo da função renal também pode resultar no decréscimo da filtração glomerular e hipóxia causada pela diminuição da perfusão nos rins. Miocardite, pericardite e disritmia são manifestações bem documentadas que podem resultar da hipoperfusão. Manifestações hepáticas, do sistema nervoso central, ocular e genital também são peculiares (BARTHI et al., 2003; LANGSTON e HEUTER, 2003; BRASIL, 2005).

2.4 Leptospirose Bovina

Os vários sorovares de *Leptospira* podem, teoricamente, infectar qualquer espécie animal, sem diferença de sexo, mas na prática existem sorovares endêmicos em determinada região ou país e adaptados aos hospedeiros naturais, favorecendo assim, sua preservação no meio ambiente (ELLIS, 1984).

Nos bovinos, segundo Moreira (1994), as leptospiroses causam consideráveis perdas econômicas em decorrência de repetições de cio, infertilidade, mastites, abortos, natimortalidade, bezerros prematuros, nascimento de bezerros fracos, morte embrionária, decréscimo na produção de leite e de carne. Sabe-se que os problemas reprodutivos atribuídos às leptospiroses em bovinos podem ocorrer sem que outra evidência clínica, como aborto, seja observada no rebanho (FAINE, 1999).

Devido a esta patogenia, o comprometimento que alguns sorovares de *Leptospira* spp. causam ao sistema reprodutor dos rebanhos levam sérios prejuízos econômicos que impactam a pecuária bovina brasileira. Muito embora não tenham sido estimadas as perdas monetárias nacionais proporcionadas pela enfermidade, existem grandes danos comerciais, principalmente pelos abortamentos, retenção de placenta, metrites, infertilidade, natimortos e crias fracas e pequenas (AMATREDJO e CAMPPELL, 1975; ELLIS, 1994, GÍRIO e MATHIAS, 1998; CARVALHA NETA et al., 2012) que podem vir a óbito nos primeiros meses de vida ou tornarem-se portadores renais da bactéria (GÍRIO e MATHIAS, 1989). A transmissão pode ocorrer por meses e até anos através do contato direto com microrganismos veiculados pela urina, assim como secreções vaginais, placenta e leite (BRASIL, 1995). Entre os animais domésticos, os bovinos são os grandes responsáveis pela manutenção e introdução das bactérias nas propriedades (VASCONCELLOS, 1997).

Os bovinos são infectados pelos sorovares hardjo, pomona, grippotyphosa e icterohaemorrhagiae. O sorovar hardjo tem sido considerado como o mais adaptado à espécie bovina, que pode comportar-se como reservatório (MOREIRA, 1994), indicando que estão presentes no mecanismo de transmissão de bovino a bovino. Uma vez introduzido no rebanho este sorovar estabelece níveis variáveis de infecção, podendo persistir por longos períodos, e a infecção por este sorovar independe de estações chuvosas e sistema de criações (ELLIS, 1994). Dois genótipos do sorovar hardjo são encontrados nos ruminantes: hardjobovis (eliminado em grande quantidade pela urina) e

hardoprajitno, descrito no Brasil (FAINE, 1999; AGUIAR et al., 2006).

Como descrito a transmissão da leptospira nesta espécie pode ocorrer pelo contato direto da pele, pelas mucosas oral e conjuntival, com a urina, via transplacentária e mamária (GUIMARÃES, 1982). Os bovinos cronicamente infectados são portadores renais e não apresentam sinais clínicos da doença e eliminam a bactéria por longos períodos, contribuindo a sua manutenção no pasto, solos úmidos, tanques e bebedouros e o contato de animais susceptíveis propiciam a sua infecção (GUIMARÃES, 1982; FAINE, 1999).

A monta natural favorece a transmissão venérea, quando realizada entre animais infectados é uma condição importante para a transmissão direta. O uso de sêmen contaminado constitui uma fonte de infecção, desde que não utilizem as normas preconizadas pela OIE, visto que o glicerol e o armazenamento em nitrogênio líquido permitem a conservação da bactéria (VASCONCELOS, 1996).

Nas criações, a disseminação da *Leptospira* é caracterizada pela presença de animais doentes ou portadores assintomáticos que eliminam o agente pela urina e descargas cervico-vaginais, além dos fetos abortados e placenta, mantendo a doença endêmica na propriedade, pois estas bactérias eliminada pela urina destes animais persistem no meio ambiente por tempo variável de acordo com as condições de umidade, temperatura e pH (FAINE, 1999).

Como a imunidade desta infecção é basicamente humoral, ganha importância para o controle na espécie bovina a existência de portadores assintomáticos renais ou genitais, visto que a sua eliminação pode ocorrer no período de um ano, e ser muito intensa nas primeiras quatro semanas, esta duração de excreção varia de acordo com o animal e o sorovar infectante (LEONARD et al., 1993).

As leptospiras podem colonizar o endométrio de vacas vazias ou prenhes, o que leva a infecção fetal com eliminação das leptospiras nas descargas uterinas pós-parto. O abortamento ocorre como seqüela de infecção sistêmica. Durante a fase de leptospiremia, há morte fetal com ou sem degeneração placentária, seguida de eliminação fetal entre 24 a 48 horas após a infecção (RADOSTITIS e BLOOD, 2000). O isolamento da leptospira em touros naturalmente infectados com sorovar hardjo, ocasiona infecção intrauterina, e isolamento da bactéria nas glândulas acessórias e testículos de touros (FAINE, 1999), portanto a leptospira pode ser isolada do sêmen e/ou plasma seminal.

7

Os sinais clínicos na leptospirose bovina podem ser divididos em duas fases distintas: a primeira, aguda, que coincide com bacteremia é observado em rebanhos jovens, e a segunda fase crônica, ocorre mais tardiamente e seus efeitos são mais aparentes no trato genital (ELLIS, 1984). Caracterizada por abortamentos natimortos, nascimentos de prematuros fracos ou normais, mais portadores do agente (CASTRO et al., 2008).

Pode ocorrer o quadro de mastite flácida ou “Síndrome da Queda do Leite” com agalactia e

pequena quantidade de sangue no leite, com queda na produção de leite que perdura até 10 dias, o leite de aspecto amarelado, com grumos e elevada contagem de células somáticas. Quando as fêmeas sofrem deste distúrbio na primeira ou segunda lactação, eles geralmente não atingem a total potencialidade de produção naquela lactação, está diretamente correlacionada com o sorovar hardjo (ELLIS, 1984).

2.5 Prevalência da Leptospirose no Brasil

Considerando a prevalência da leptospirose no território brasileiro e em alguns estados em separado, observa-se índices bem variados, fato este explicado pelas condições ambientais de ordem físico-química e sócio-econômico-cultura, as quais favorecem a persistência e a disseminação da infecção, caracterizando uma doença sazonal, com picos endêmicos no verão ou outono em regiões de clima temperado ou durante as estações de chuva nas regiões quentes (OIE, 2012).

Como referência o Instituto Biológico de São Paulo, São Paulo/SP, para o diagnóstico laboratorial da leptospirose, utilizando a técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM), há o relato de Santa Rosa et al. (1969/70), avaliaram os soros enviados no período de 1960 a 1968, de um total de 15.080 bovinos, provenientes de nove estados: SP, PR, PE, MG, GO, RS, AP, PA e RJ, encontraram 23,6% de positividade com predominância do sorovar wolffi. Giorgi et al. (1981) em novo inquérito sorológico realizado em 11 estados do território nacional: SC, PR, SP, RJ, MG, MS, GO, BA, PE, PB e PA, com 644 bovinos, durante o período de 1974 a 1980, encontraram 27,17% de animais sororeativos. As variantes mais freqüentes foram: wolffi, pomona e tarassovi. Vasconcelos et al. (1997), relataram níveis de ocorrência e variante sorológicas predominantes em cinco estados da união: MG, SP, RJ, PR, RS., a distribuição das variantes sorológicas mais prováveis, foi: hardjo (75,0%); wolffi (8,92%); pomona (3,57%); grippotyphosa (1,78%) e australis (1,78%).

Favero et al. (2001) apresentaram as variantes sorológicas de leptospiros predominantes nos exames de soroaglutinação microscópica (SAM) efetuados no período de 1984 a 1997 em 31.325 bovinos de 1920 propriedades distribuídas em 540 municípios de 21 estados do Brasil, utilizaram a coleção de antígenos, fornecida pelo Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. A distribuição percentual dos animais examinados por estado incluiu: os percentuais de animais reatores para pelo menos uma variante sorológica apresentaram a média de 37,94% , com flutuações na faixa de 25,2 a 38,3% nos estados de SC, CE, PR, DF, SP e PA; de 40,7 a 58,4% nos estados de PB, TO, R.J, MG, GO, RO, RN, PI, MA e AL e superior a 61,0% nos estados da BA, ES, MS e MT. As variantes sorológicas mais prováveis por rebanho, foram reações para a variante hardjo nos rebanhos do estado do RN e DF; hardjo e wolffi no MA, AL, BA, ES, MS, SP, RJ e GO; hardjo e grippotyphosa em TO, hardjo, castellonis e patoc em SC; hardjo, wolffi e grippotyphosa no CE;

hardjo, wolffi e pomona no PR e MG; hardjo wolffi e pyrogenes no RS e RO; hardjo, icterohaemorrhagiae e pyrogenes na PB; hardjo, wolffi e hebdomadis no PI. A predominância do sorovar hardjo em bovinos no Brasil concorda com os achados verificados em outros países, prevalente em gado leiteiro de diversos continentes, devido preferencialmente pelo comércio internacional de reprodutores ou de materiais de multiplicação (RENDE e AVILA, 2003).

No Estado do Rio Grande do Sul, Oliveira (1977), testou 184 soros de bovinos provenientes de cinco municípios do Estado (Santa Rosa, Nova Petrópolis, Estrela, Encantado, Erexin, Guaporé, Gaurama) e um município do Estado de Santa Catarina (Concórdia) encontrando uma positividade de 42,6% para o sorogrupo sejrøe e 38,3% para o sorovar wolffi. Brod et al. (1994) em novo inquérito sorológico, no mesmo estado, com 3.265 bovinos, distribuídos em 282 propriedades, descreveram uma prevalência de 41,49% de sororeativos, com predominância dos sorovares hardjo e wolffi.

Em Minas Gerais, Moreira et al. (1979), examinaram 3.727 bovinos em um experimento delineado com amostragem aleatória planejada para determinação de prevalência e observaram 12,10% wolffi, 11,11% hardjo; 5,85% grippotyphosa; 5,15% icterohaemorrhagiae e 2,20% canicola. Este foi o primeiro registro de bovinos sororeativos para a variante sorológica hardjo no Brasil; saliente-se contudo que nesta ocasião a frequência de reatores para a variante sorológica wolffi foi superior à observada para hardjo.

No Estado do Rio de Janeiro, Lilenbaum e Santos (1996) analisaram o efeito das práticas de manejo sobre a ocorrência da leptospirose bovina e examinaram 405 vacas de diferentes regiões do estado, abrangendo os municípios de: São Fidélis, São Pedro, Casimiro, Macaé, Itaperuna, Campos, Miracena, Marica, Cachoeiras, Teresópolis, Petrópolis, Magé, Três Rios, Vassouras, Resende, Barra do Piraí, Paraíba do Sul, em rebanhos que apresentavam desordens reprodutivas e encontraram 68,0% de positividade para pelo menos uma variante sorológica, com, reações mais frequentes para as variantes: hardjo (21,0%), wolffi (14,0%), bratislava (9,0%) e pomona (5,0%). Seguindo com a mesma linha de pesquisa com rebanhos leiteiros com problemas de fertilidade Lilenbaum e Souza (2003) encontraram positividade em 46,9% das vacas examinadas.

No Estado de São Paulo, Melo (1999), examinaram 951 bovinos de rebanhos produtores de leite C, abrangendo os municípios de Pirassununga, Santa Cruz da Conceição, Tambaú, Analândia e Mococa e encontraram 78,8% de animais positivos para pelo menos uma variante sorológica, com predomínio das variantes hardjo e wolffi. Langoni et al. (2000), examinaram 2.761 bovinos de sete municípios deste estado: Bauru, Araçatuba, Campinas, Marília, Presidente Prudente, São José dos Campos e Sorocaba, encontraram 45,56% de positividade, com predominância de wolffi (70,59%); hardjo (67,57%); pyrogenes (27,90%); canicola (25,91%); bratislava (23,97%); pomona (10,81%); grippotyphosa (5,56%), castellanis (4,13%); icterohaemorrhagiae (3,97%); copenhageni (3,30%);

tarassovi (3,18%) e djasiman (2,16%). Del Fava et al. (2004) avaliaram coeficientes reprodutivos e características de desempenho em fêmeas de um rebanho bovino de corte, obtiveram como resultado 48,3% das fêmeas sororeativas a leptospirose.

Ribeiro et al. (1999), pesquisaram a presença de aglutininas para *Leptospira interrogans* em 321 bovinos da sub-região de Nhecolândia, no MS e encontraram 78,19% de positividade para pelo menos uma das 14 variantes sorológicas testadas, com predominância para sorovares wolffi (18,66%) e hardjo (17,70%).

Os sorovares que se destacam pela alta frequência nos rebanhos bovinos são wolffi e hardjo (JULIANO et al., 2000), conforme indicado na Tabela 2. Contudo, reações cruzadas entre hardjo e wolffi são muito comuns devido às relações antigênicas existentes entre ambos, que são pertencentes ao mesmo sorogrupo, o sejroe (COSTA et al., 1998).

Tabela 2 Prevalência de anticorpos anti-*Leptospira sp* em bovinos oriundos de diferentes Estados brasileiros, de 1998 a 2012.

Ano	Autores	Estado	No. Animais	Prevalência (%)	Método de diagnóstico	Sorovar
1998	Rodrigues et al.	Paraná	1253	71,43	SAM*	Icterohaemorrhagiae
1999	Juliano et al.	Goiania	426	81,9	SAM	Wolffi
2003	Lilenbaum e Souza	Rio de Janeiro	379	46,9	SAM	Hardjo
2004	Del Fava et al.	São Paulo	712	48,3	SAM	Hardjo
2005	Araujo et al.	Minas Gerais	7653	19,7	SAM	Harjo
2006	Campos et al.	Goiania	140	74,2	SAM	Wolffi
2007	Mineiro et al.	Piauí	1975	52,9	SAM	Hardjo
2008	Castro et al.	São Paulo	8216	49,4	SAM	Hardjo

2010	Oliveira et al.	Bahia	10823	77,9	SAM	Hardjo
2010	Lopes et al.	Bahia	1841	76,2	SAM	Autumnalis/Hardjo
2011	Genoves et al.	São Paulo	5116	67	SAM	Hardjo
2011	Hashimoto et al.	Paraná	188	66,06	SAM	Hardjo
2011	Silva et al.	Maranhão	4832	35,94	SAM	Hardjo
2012	Herrmann et al.	Rio Grande do Sul	136	38,75	SAM	Hardjo

⑩ SAM: Soroaglutinação Microscópica

2.6 Diagnóstico da Leptospirose

O diagnóstico inicial da leptospirose animal tem como base a associação de aspectos clínicos, epidemiológicos e provas laboratoriais. Dentre as provas laboratoriais existem os **Métodos Diretos**, que demonstram a presença do microrganismo ou do seu ácido desoxirribunucleico (DNA) e os **Métodos Indiretos**, que demonstra a presença de anticorpos induzidos pelo agente etiológico.

Os resultados dos exames sorológicos aplicados ao diagnóstico da leptospirose dependem da técnica empregada, da coleção de antígenos adotada, do ponto de corte da reação e também de variáveis relacionadas ao tamanho dos rebanhos, localização das propriedades e período do ano em que as colheitas foram efetuadas (FAINE, 1982). A dinâmica destes fatores torna necessária a existência de um sistema permanente de vigilância epidemiológica que possibilite o monitoramento da distribuição espacial das variantes sorológicas de leptospiras presentes na população bovina do País.

2.6.1. Métodos Diretos

As provas laboratoriais diretas incluem: microscopia de campo escuro, cultura, histopatologia, visualização em campo claro com corantes especiais, imunohistoquímica e imunofluorescência direta (FAINE, 1982), bem como as técnicas moleculares que revelam a presença do DNA das leptospiras (LEVETT, 2004).

11

A microscopia de campo escuro pode detectar o microrganismo nos tecidos ou humores orgânicos, os resultados dependem da fase de evolução da infecção: sangue e líquido cefalorraquidiano, na fase aguda (leptospiemia), urina na fase crônica (leptospiúria). É um método rápido, porém apresenta baixa sensibilidade e especificidade, pois a presença de artefatos nos fluídos corporais podem dificultar a visualização e presença de outras estruturas podem ser confundidos com leptospiras (OIE, 2012; BOLIN; ALT, 1999).

A cultura visando o isolamento do agente pode ser feita através de amostras de sangue, urina, sêmen, secreção uterina de vacas que abortaram e líquido gástrico de bezerros recém-abortados, bem como de material coletado post-mortem (tecidos e órgãos). Geralmente, a urina deve ser cultivada a partir do segundo dia da infecção, é o fluído ideal para cultura (GREENE et al., 2006). Utilizam-se meios de cultivos sintéticos, de preferência contendo soro de coelho, podem ser semi-sólido Fletcher

e Harris (EMJH), e os meios líquidos Korthoff, e Stuart (FAINE, 1982; FAINE et al., 1999). As culturas são incubadas a uma temperatura entre 28 e 30°C e examinadas semanalmente por microscopia de campo escuro. As técnicas de isolamento pelo cultivo são demoradas e laboriosas, é o único que permite a identificação definitiva do sorovar infectante, informação necessária para a condução de estudos epidemiológicos e orientação das estratégias profiláticas (VASCONCELOS, 1987; LEVETT, 2007).

As leptospiras podem ser visualizadas por meio da microscopia de campo escuro ou contraste de fase; através das técnicas de coloração como as do Giemsa, Vermelho Congo ou impregnação pela prata (Levaditi). Essas técnicas são de baixa sensibilidade e especificidade, visto que as leptospiras são passíveis de serem confundidas com fibrina e com outras estruturas celulares (GOMES, 2011).

Outras técnicas têm sido desenvolvidas para a detecção de leptospiras nos tecidos tais como a Imunofluorescência Direta e a Imunohistoquímica, porém estão restritas a estudos experimentais com pouca aplicação no diagnóstico de casos clínicos (LEVETT, 2001).

A técnica de Reação em cadeia de Polimerase (PCR) tem sido referida como uma das mais promissoras para diagnóstico precoce da doença. Apesar de a técnica ter seu uso restrito à área de pesquisa ou de laboratórios de referência, a facilidade de obtenção do DNA leptospira em quaisquer fluidos biológicos, não necessitando da presença de anticorpos, torna o diagnóstico possível em estágios iniciais da doença. Os métodos genéticos têm provado serem de grande valor na caracterização de cepas de *Leptospira*; no entanto, esses precisam ser aprimorados na busca por técnicas mais precisas e rápidas para essa tipificação (MORIKAWA, 2011). Porém, a limitação do diagnóstico está na inabilidade em se identificar o sorovar infectante.

2.6.2 Métodos Indiretos

A técnica básica é a soroaglutinação microscópica (SAM) com antígenos vivos ou formolizadas, pelo soro do homem ou de animais. Recomenda-se a realização de pelo menos dois exames: um no início e outro a partir da quarta semana de doença (FAINE et al., 1999). Essa técnica não contribui claramente para o diagnóstico precoce de leptospirose, além do alto custo de manutenção de uma bateria de leptospiras, representante de diversos sorogrupos, mantida com repiques semanais, os pacientes podem vir a óbito antes que a soroconversão ocorra (SMYTHE et al., 2002).

É o teste sorológico mais utilizado na rotina clínica e indicado como teste de referência pela Organização Mundial de Saúde (OMS). A base diagnóstica do SAM é formada pela reação de

aglutinação entre os anticorpos presentes no soro dos pacientes e o antígeno dos LPS de membrana de vários sorovares de *Leptospira* spp. Trata-se de uma técnica bastante empregada em inquéritos epidemiológicos, podendo fornecer informações a respeito dos sorogrupos importantes da região em questão, os quais devem estar incluídos na bateria de antígenos a ser testada. A maior dificuldade encontra-se na interpretação dos resultados, visto que os soros de indivíduos com títulos positivos geralmente apresentam reações cruzadas a uma variedade de sorovares, dificultando assim a identificação do sorovar infectante. A demonstração de um aumento de pelo menos quatro vezes no título em amostras pareadas, confirma a soroconversão. Em áreas endêmicas, uma única amostra com título igual ou maior a 800 pode ser considerada diagnóstica, mas se recomenda a utilização de iguais ou maiores que 1.600 para essa decisão.

2.7 Epidemiologia

A prevalência da leptospirose no rebanho leiteiro depende da existência de um indivíduo portador, que elimina a leptospira pela urina, a contaminação do ambiente com leptopiras vivas, a sobrevivência das mesmas no ambiente com leptopiras vivas no ambiente e o contato dos indivíduos susceptíveis com o agente (NIANG et al., 1994). Como a *Leptospira* persiste no ambiente por dias a meses em cursos d'água, solos úmidos, tanques e bebedouros, o contato com estes locais de animais susceptíveis propicia a infecção (FAINE et al., 1999). Embora seja bastante conhecido o impacto da leptospirose na esfera reprodutiva, não existem estudos da quantificação das perdas para as cadeias produtivas da carne e leite. Além de problemas reprodutivos, a leptospirose bovina provoca queda na produção de leite (LILENBAUM; SANTOS, 1995).

13

Lacerda et al. (2002) observaram que os maiores títulos de anticorpos contra *L.interrogans* sorovar *wolffi* são observados no início da lactação, ao passo que nos animais em final de lactação os títulos observados no soro sanguíneo são mais elevados do que aqueles observados no soro lácteo. Os bovinos cronicamente infectados são portadores renais e não apresentam sinal clínico, porém eliminam a bactéria pela urina por longos períodos de tempo, contribuindo desta maneira para a manutenção da infecção nos rebanhos acometidos (GUIMARÃES et al., 1982, 1983). A transmissão pode ocorrer pelo contato com urina de animais infectados, descargas uterinas após abortamentos, placenta infectada, contato sexual ou infecção intra-uterina, ou então pela exposição a um ambiente contaminado (ELLIS, 1994).

A infecção em bovinos pode ser classificada em dois grupos principais: o primeiro consistindo nos sorovares adaptados e mantidos pelos bovinos, como Hardjo, o segundo consiste em infecções

incidentais causadas por sorovares mantidos por outros animais domésticos ou silvestres (ELLIS, 1984). Lilenbaum e Santos (1996) observaram que o manejo do rebanho tem um impacto significativo não só na prevalência da leptospirose como um todo, mas também na distribuição dos sorovares. Fatores como tamanho do rebanho, forma de reposição de animais e tipo de rebanho – leite ou corte parecem ser importantes para a ocorrência da doença (ALONSO-ANDICOBERRY et al., 2001). A mortalidade embrionária e fetal afeta de forma significativas os índices reprodutivos dos rebanhos bovinos (PITUCO; DEL FAVA, 2003). A leptospirose também ocasiona queda na produção de leite (LILENBAUM e SANTOS, 1995) e o sorovar wolffi está correlacionado com o quadro de infecção no início da lactação, e no final de lactação observa títulos mais elevados no soro sanguíneo do que o lácteo (LACERDA et al., 1996).

Os fatores riscos para leptospirose têm sido estudados principalmente para o rebanho leiteiro, estão associados ao tamanho do rebanho, co-pastoreio de gado ou ovelhas infectadas, o acesso do gado às fontes de águas contaminadas, uso de um touro infectado, práticas de criação inadequadas e introdução de animais provenientes de outras propriedades sem diagnóstico, causam aumento da soroprevalência (ELLIS, 1983, ELLIS, 1994 e LILENBAUM E SANTOS, 1996).

Hashimoto et al. (2012) detectaram 181/274 rebanhos positivos para a *Leptospira* spp., com a prevalência de rebanhos de 66,06%, foram incriminados como fatores de risco: compra de reprodutores, aluguel de pasto, presença de piquete de parição. Estes resultados indicam que a infecção pela *Leptospira* spp está amplamente distribuída na região centro-sul do estado do Paraná e as características das propriedades e o manejo estão associados a infecção.

Outro fator que contribui para a ocorrência da leptospirose no rebanho, são os fatores climáticos, condições de umidade e grandes oportunidades de exposição aos contaminantes (LEVETT, 2001), tornaram a leptospirose uma doença cosmopolita, comum a várias espécies (MINEIRO et al., 2007).

14

Entre os fatores climáticos estão relacionados as águas da chuva, as correntezas que inundam as rachaduras provocadas pela dessecação, fazendo com que as leptospiras sejam liberadas para o ambiente, atingindo as águas e as camadas superficiais do solo, fechando o ciclo de infecção. Na água e no solo, leptospiras patogênicas também conseguem sobreviver, dependendo do pH. Nos solos com poças de água de chuvas, sobrevivem por até três semanas (LEVETT, 2001), que permitem sua manutenção e multiplicação da *Leptospira* sp. (HERHOLZ et al., 2006).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de Execução

O estudo foi conduzido no Setor de Bovinocultura Leiteira, do Campus de Pinehiral, do Instituto Federal do Rio de Janeiro, no município de Pinheiral, situado no Vale do Médio Paraíba, Estado do Rio de Janeiro. Localiza-se a uma latitude $22^{\circ}30'46''$ sul e a uma longitude $44^{\circ}00'02''$ oeste, estando a uma altitude de 345 metros (Figuras 1 e 2). Esta região caracteriza por uma topografia acidentada, com poucas varzeas usualmente férteis. O clima da região, segundo Koppen, é do tipo CWA mesotermico caracterizado por verões quentes e chuvosos, com precipitação média anual de 150,3 mm, 109,5 mm e 97,36 mm, nos anos de 2010 a 2012, respectivamente. Com a temperatura média oscilando entre $38,80^{\circ}\text{C}$ em 2010, de $20,81^{\circ}\text{C}$ em 2011 e $20,67^{\circ}\text{C}$ em 2012.

No período de junho de 2011 a dezembro de 2012, foram feitas as coletas das amostras de sangue, exame ginecológico das fêmeas, anotações de dados de produção e de reprodução, bem como a coleta dos dados climáticos, obtidos da estação meteorológica do IRJ- CANP. As amostras foram encaminhadas ao laboratório de Patologias da Reprodução e Coccídios e Coccidioses (LCC), localizados no prédio do Projeto Sanidade Animal (PSA) (Embrapa/UFRRJ), Seropédica/RJ, e o processamento das amostras para serem enviadas ao Instituto Biológico de São Paulo, Laboratório de Doenças Bacterianas, no município de São Paulo/SP.

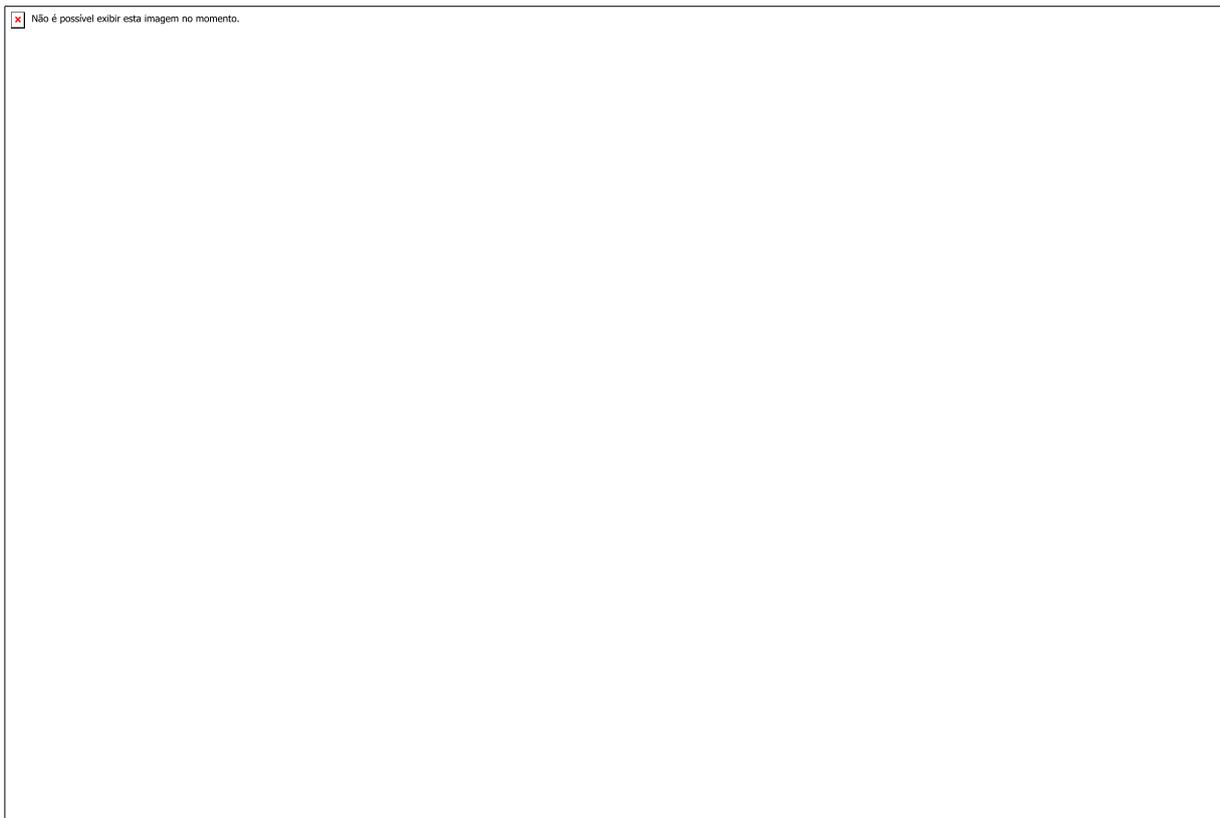


Figura 1: Área da Unidade de Ensino e Produção do IFRJ, Campus Nilo Peçanha – Pinheiral - RJ

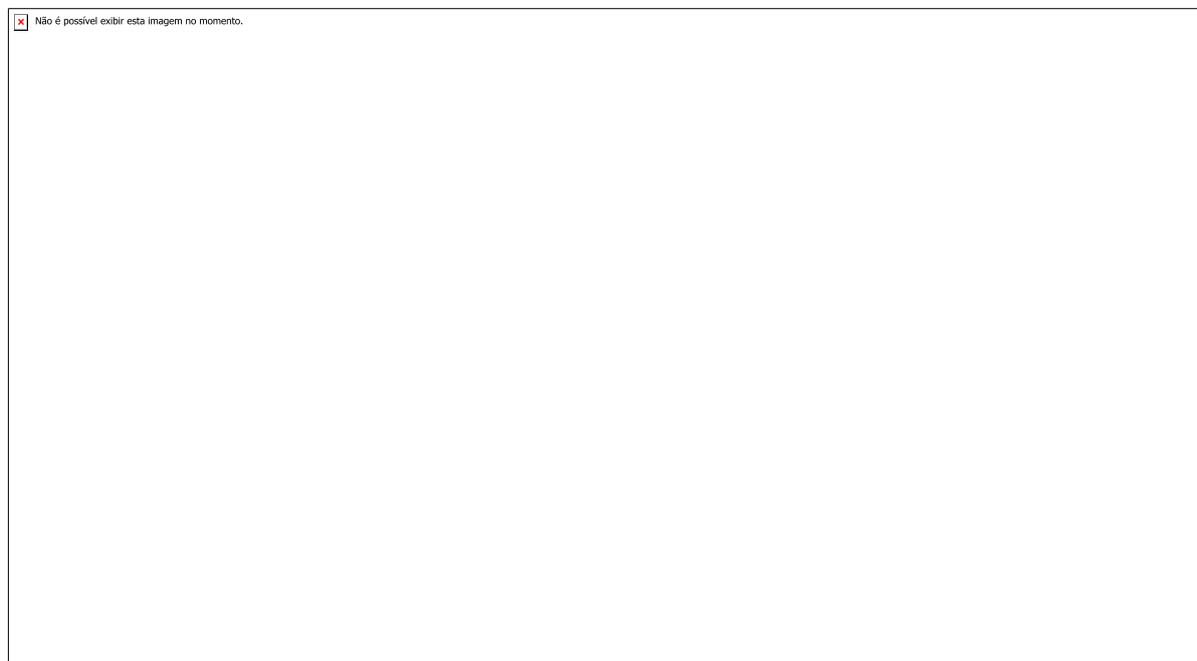


Figura 2: Curral de ordenha/ Unidade de Ensino e Produção Bovino de leite /IFRJ – Campus Nilo Peçanha - Pinheiral

3.2 Animais

O rebanho utilizado é composto por 49 vacas girolandas, do grupo genético 1/2 HPB (holandês preto e branco) + 1/2 GL (gir leiteiro) a 7/8HPB + 1/8 GL, com produção média de 14,5 Kg de leite/vaca/dia. Este rebanho está composto por 49 animais, assim discriminados: 35 vacas (27 em lactação e 8 secas); 1 novilha acima de 24 meses; 10 bezerras com 12 meses e 3 bezerras em amamentação.

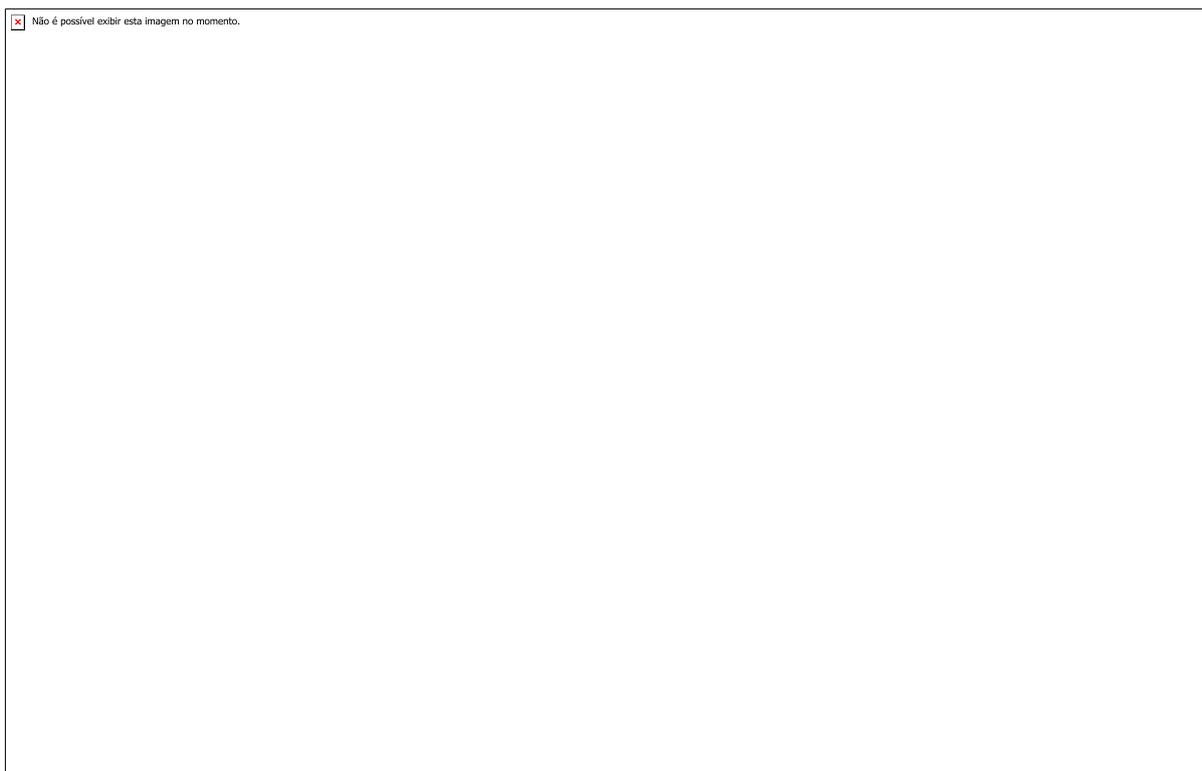


Foto 3 : Unidade de Ensino e Produção Bovino Leite – IFRJ, Campus Pinheiral : Conforto Animal

A alimentação das vacas em lactação é composta de pasto, durante todo o ano, consumindo ponta da pastagem, enquanto vacas secas e novilhas consumirão o restante. No sistema da Bovinocultura de leite, utilizam para pastagem uma área plana de 300 hectare dividido em 15 piquetes, com sistema rotacional (em média de cinco dias de uso/ 35 dias de descanso). Os pastos formados por *Digitaria decumbens* variedade *Translava* e *Digitaria swazilandensis*, *Cynodon nlemfuensis* (capim Estrela), *Brachiaria mutica* (capim Angola) e *Pennisetum purpuram* cv *Cameroon*. Foi fornecido a suplementação de ração balanceada durante a ordenha, pela produção da vaca, e suplementação mineral ad libitum em cochos no pasto, durante todo o ano, utilizando 70% de sal grosso + 30% complementação de minerais (calcio, fosforo, enxofre, zinco, cobre, ferro, cobalto iodo e outros).

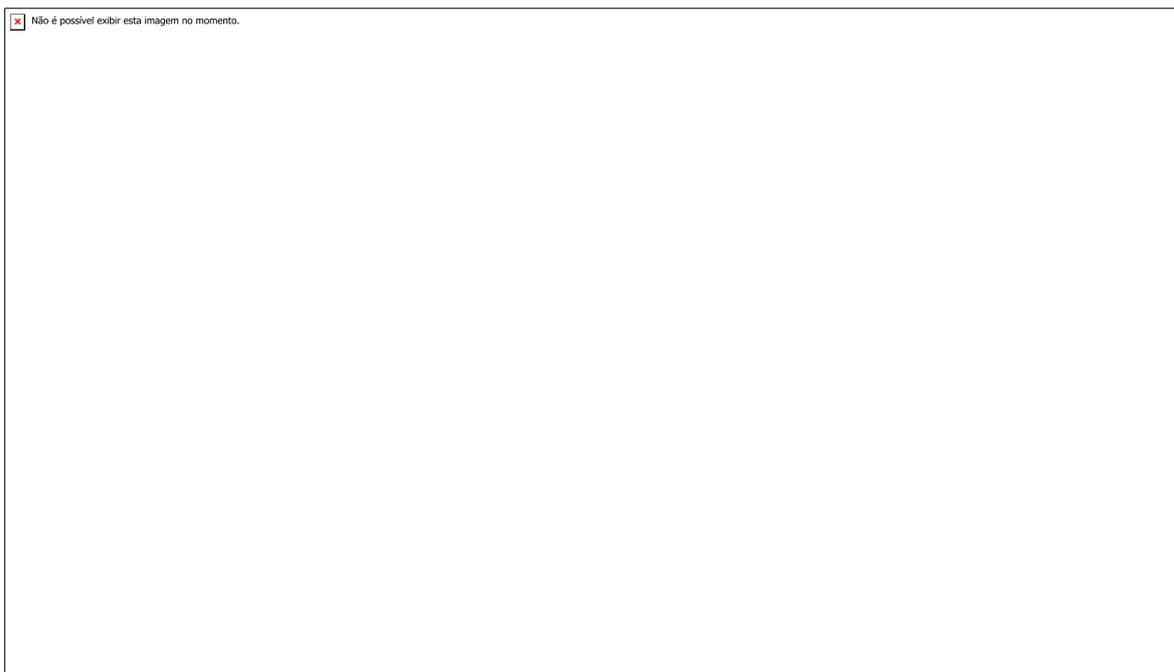


Foto 4: Pastos Unidade de Ensino e Produção Bovino Leite – IFRJ – Campus Pinheiral

Todas as fêmeas em reprodução, foram observadas duas vezes ao dia para a detecção de cio, e inseminadas com semen de touros HPB em animais 1/2 e 3/4 HPB. As novilhas são inseminadas pela primeira vez com peso mínimo de 300 kg e idade superior a 18 meses completos. A primeira inseminação pós-parto foi realizada após o período de serviço de 60 dias/parto. O diagnóstico de gestação, foi feito através de toque retal, em torno de 35 dias após a última inseminação, e periodicamente será feito durante este estudo procedimentos de exames ginecológicos para a avaliação de ocorrência de falhas reprodutivas (repetições de cios, cisto folicular, etc.).

Executam a ordenha duas vezes ao dia, às 6:00 e 15 horas, com o controle leiteiro sendo feito semanalmente. A secagem ocorrerá aos 60 dias antes do parto provável, ou se a produção for inferior a 3 Kgs de leite/dia em três controles consecutivos.

Quanto a sanidade do rebanho nos recém-nascidos realizam o corte e desinfecção do umbigo e o esquema de vacinação: Raiva, Febre Aftosa, sendo a primeira vacinação aos quatro meses e revacinações periódicas anuais e semestrais, respectivamente. Aos quatro meses de idade, a vacinação contra brucelose. Nas fêmeas adultas e novilhas anualmente faz-se exame para brucelose, tuberculose e controle da mastite pelo CMT (California Mastit Test) e Contagem de células somáticas (CCE). Realizam o controle de endo e ectoparasitos por produtos comerciais a base de benzimidazóis com levamisóis (vermífugos) e ivermectinas (bernicidas e carrapaticidas), mudando o princípio ativo de acordo com a infestação do rebanho.

Foram utilizados agulhas descartáveis, de uso individual, o sangue foi acondicionado em tubos vacutainer e quando obtido o soro, o mesmo foi acondicionado em frascos eppendorf com capacidade de 2,0 mL.

O trabalho foi conduzido no setor de bovinocultura de leite do Instituto Federal do Rio de Janeiro (IFRJ), Campus Pinheiral, e o processamento da separação do soro, acondicionamento das alíquotas foram processadas no Laboratório do Setor de Reprodução Animal, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica/RJ e as amostras refrigeradas, neste laboratório, foram enviadas ao Laboratório de Doenças Bacterianas da Reprodução, no Instituto Biológico de São Paulo, Estado de São Paulo.

A coleta dos dados sobre a produção de leite mensal individual das vacas e os dados das fichas individuais, tais como a detecção de cio, abortamentos, metrites e tratamentos realizados, data da cobertura, data de nascimento das crias, foram fornecidos pelo técnico agrícola responsável pelo Setor de Bovinocultura de Leite do campus, pois esta coleta de dados é rotina no setor. O exame ginecológico das fêmeas em reprodução foi acompanhado pelo Prof. José Eugênio Três (UFRRJ).

3.4 Sorodiagnóstico para Leptospirose bovina

Foram realizadas três coletas entre os meses de junho de 2011 a dezembro de 2012, através da venopunção da veia mamária, com agulha descartável e tubo com vácuo sem anticoagulante, com capacidade de 10 mL. Os tubos foram identificados com um código do laboratório, relativos à coleta e ao animal. Após o dessoramento, cada amostra sorológica foi transferida para um eppendorf, identificado e armazenado em freezer a menos 20°C.

Os dados obtidos serão introduzidos em planilhas de excell. Foram previstas três amostras de sangue das fêmeas em lactação do rebanho, nos períodos de junho/2011; março de 2012 e dezembro de 2012.

3.5 Técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM)

A técnica de soroaglutinação microscópica (SAM) com antígenos vivos (FAINE et al., 1999), prova de referência pela Organização Mundial da Saúde-OMS (2011) para o diagnóstico da leptospirose, foi empregada para mensuração dos níveis de aglutininas para todas as amostras de soros e foi realizada no Laboratório de Doenças Bacterianas do Instituto Biológico de São Paulo.

Os soros foram mantidos à temperatura ambiente para descongelamento. Uma alíquota de

100µL foi recolhida com auxílio de pipeta automática, devidamente calibrada e adicionada a 4,9 mL de solução salina de Sorensen. Cada amostra foi testada com 24 sorovares da coleção de referência (Icterohaemorrhagiae, Canicola, Pomona, Grippotyphosa, Wolffii, Hardjo, Australis, Autumnalis, Bataviae, Bratislava, Butembo, Castellonis, Copenhagni, Cynopteri, Heddomalis, Javanica, Panama, Pyrogenes, Shermani, Tarassovi, Whitcombi, Sejroe). Foi empregada a microtécnica de soroaglutinação microscópica (GALTON et al. 1965; COLE JR., 1973).

O resultado do sorodiagnóstico foi analisado de acordo com o critério de verificação do sorovar mais provável, com a transformação da recíproca da maior diluição em logaritmo de base dez e foram descartados os resultados de animais cujo maior título foi idêntico para mais de um dos sorovares testados (VASCONCELLOS et al., 1997).

3.6 Antígenos

A soroaglutinação microscópica foi realizada com uma coleção de culturas vivas de *Leptospira spp.*, totalizando 24 variantes sorológicas, descritas anteriormente. As culturas de leptospiros foram mantidas em meio líquido de EMJH (DIFCO) modificado por Alves (1996) suplementado com 15% de soro estéril de coelho enriquecido com 1% de piruvato de sódio, 1% de cloreto de cálcio, 1% de cloreto de magnésio e 3% de L-asparagina. O soro de coelho foi inativado pelo tratamento térmico 56°C por 30 minutos. As culturas foram incubadas durante sete a dez dias em estufa bacteriológica a 28°C.

3.7 Titulação

Os soros reagentes na triagem foram novamente testados para a determinação do título final de aglutininas antileptospiros, efetuando-se diluições seriadas em escala geométrica de razão dois em solução salina tamponada de Sorensen e acrescidas de 50 µL do antígeno que reagiu como positivo no teste de triagem. As microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica a 28°C por três horas.

Quanto a leitura e interpretação foram realizadas em microscópio óptico Jena Zeiss, com condensador de campo escuro seco, com lente objetiva Epiplan 10 x 0,20 e de ocular 10 (100x), observando-se a formação de aglutinações. O grau de aglutinação foi lido e avaliado com base no seguinte critério do Instituto Biológico de São Paulo:

1+: pelo menos 25% das leptospiros estavam aglutinadas no campo microscópico

2+: quando ocorrido em 50% delas

3+: quando cerca de 75% se achavam aglutinadas.

4+: quando a aglutinação estava entre 75 a 100%.

O título das reações positivas foi considerado a recíproca da mais alta diluição do soro, na

mistura soro-antígeno que apresentou 50% ou mais das leptospiras aglutinadas por campo microscópico (FAINE et al., 1999). Esta percentagem foi tomada tendo como referência o tubo controle: volumes iguais (0,05 mL) de solução salina de Sorensen acrescido ao antígeno. Os soros reatores na triagem (diluição 1:100) foram titulados com os respectivos antígenos reagentes.

O provável sorovar infectante foi o que apresentou o maior título. Na ocorrência de empate sorológico para dois ou mais sorovares, o animal foi desconsiderado desta análise.

3.8 Cálculo de Índices de Produtividade

Foram calculados a produção acumulada do rebanho; produção média diária durante as lactações e produção por estação do ano, para avaliação destes índices produtivos do sistema, foram considerados lactações de 308 dias, ajustando-se aquelas cujas durações tenham sido inferior a esse limite. Para as que forem de duração superiores, será computado apenas os primeiros 308 dias, desprezando o restante, em razão do controle leiteiro ser semanal.

3.9 Cálculo dos Índices Reprodutivos

Foi avaliada a performance reprodutiva para as vacas em lactação reagentes e não reagentes a leptospirose bovina, através dos seguintes serviço por concepção, período de serviço, intervalo de partos, índice de gestação e índice de parição, segundo (CORTES, 1993).

a). Serviço por concepção: contabiliza-se o número de inseminações que cada vaca teve até se torna gestante durante a lactação atual.

b). Período de Serviço: intervalo em dias do parto até a data da inseminação que originou a prenhez, usualmente os valores de referência (100 a 120 dias).

c) Intervalo de partos: período em meses ou em dias de intervalo do parto a outro.

d) Índice de gestação: proporção fêmeas gestantes em um ano, em um total de vacas inseminadas.

e). Índice de parição: proporção de fêmea que geraram bezerros vivos em um total de fêmeas com diagnóstico de gestação positivo.

3.10 Análise dos fatores de risco

Na identificação de possíveis fatores de risco associados à condição de soro-reagentes para leptospirose, foi utilizado o procedimento de estudos observacionais de caso controle (THRUSFIELD, 1995), efetuado com os dados colhidos em uma entrevista. As variáveis independentes (possíveis fatores de risco) foram categorizadas (LATORRE, 2004). As variáveis quantitativas foram: tipo de exploração; tipo de criação: confinada, semi-confinada e extensiva; Utilização de inseminação artificial: não e sim (com ou sem uso de touro); Tamanho do rebanho; outras espécies na propriedade: ovinos, caprinos, eqüídeos, suínos e cão; presença de animais silvestres na propriedade, incluindo cervídeos; destino de fetos abortados e placenta (enterra/joga em fossa/queima, alimenta porco/cão e não faz nada); compra reprodutores: de qualquer origem, em exposição, em leilão/feira, de comerciantes de gado e diretamente de outras fazendas; aluguel de pastos; abate de reprodutores na propriedade; utilização de pastos compartilhados; existência de áreas alagadiças acessíveis ao gado; utilização de piquetes de parição; tem assistência veterinária; venda de animais para a reprodução; vacinação contra brucelose.

3.11 Análise estatística

Para a avaliação de variáveis qualitativas entre proporções de animais não e reagentes a Leptospirose bovina, como ocorrência da infecção e os índices reprodutivos e de produtividade, foram empregados testes do Qui-quadrado e o Teste exato de Fisher, quando recomendado, fixando o erro em 5%, utilizando o programa GraphPad InStat para o cálculo destes testes (SAMPAIO, 2002). Investigou-se as fichas individuais dos animais, relacionando a produção leiteira, distúrbios reprodutivos, análise conjunta com os resultados sorológicos da leptospirose.

4. Resultados e Discussão

4.1 Resultados Sorológicos da SAM

A percentagem de reagentes para *Leptospira interrogans* foi de 52,17%, na primeira coleta em junho de 2011, demonstrado na tabela 3. A maior prevalência de infecção foi encontrada para o sorovar Wolffii (54,17%), seguida de Hardjo e Brastilava. O sorovar com menor prevalência foi Pomona (4,17%). O sorovar mais frequente, também, revelou maiores títulos (1:400 e 1:800), exceto Pomona, com título máximo de 1:400, mas de baixa prevalência. Observou-se que havia no rebanho examinado animais infectados por, pelo menos, um sorovar e como a vacinação para leptospirose não é realizada, pode-se admitir que tais valores referem-se à infecção natural.

Tabela 3 Resultados soro-reagentes a *Leptospira interrogans*, das 49 vacas leiteiras do rebanho do Campus Pinheiral/ IFRJ, do Estado do Rio de Janeiro, em junho de 2011.

Sorovares	Títulos				Total	(%)
	100	200	400	800		
Wolffii	3	3	4	3	13	54,17
Hardjo	5	3	0	0	8	33,33
Brastilava	1	1	0	0	2	8,33
Pomona	0	0	1	0	1	4,17
Total	9	7	5	3	24	100

A percentagem de reagentes para *Leptospira interrogans* foi de 50,00%, na segunda coleta em março de 2012, tabela 4. A maior prevalência de infecção foi encontrada para o sorovar Hardjo (60,0%), seguido Wolffii (25,0%). Os sorovares com menores prevalências foram Brastilava, Copenhagni e Grippytyphosa (5,0%). O sorovar mais frequente, revelou títulos (1:400 e 1:800), exceto Grippytyphosa, com título máximo de 1:800, mas de baixa prevalência. Observou-se que havia no rebanho examinado animais infectados devido a infecção natural, visto que não adotavam ainda a vacinação no rebanho.

Tabela 4 Resultados soro-reagentes a *Leptospira interrogans*, das 49 vacas leiteiras do rebanho do Campus Pinheiral/ IFRJ, do Estado do Rio de Janeiro, em março de 2012.

Sorovares	Títulos					Total	(%)
	100	200	400	800			
Wolffi	3	0	1	1	5	25,0	
Hardjo	5	3	3	1	12	60,0	
Bratislava	1	0	0	0	1	5,0	
Copenhagni	0	0	1	0	1	5,0	
Grippotyphosa	1	0	0	0	1	5,0	
Total	10	3	5	2	20	100,0	

A percentagem de reagentes para *Leptospira interrogans* foi de 42,85%, na terceira coleta em junho de 2012, demonstrado na tabela 5. A maior prevalência de infecção foi encontrada para o sorovar Wolffi (53,33%), seguido Hardjo (33,33%). Os sorovares com menores prevalências foram Bratislava e Pyrogenes (6,7%). Observou-se que havia no rebanho examinado animais infectados devido a infecção natural, visto que não adotavam ainda a vacinação no rebanho.

Tabela 5 Resultados soro-reagentes a *Leptospira interrogans*, das 49 vacas leiteiras do rebanho do Campus Pinheiral/ IFRJ, do Estado do Rio de Janeiro, em junho de 2012

Sorovares	Títulos					Total	(%)
	100	200	400	800			
Wolffi	3	2	2	1	8	53,33	
Hardjo	2	1	0	2	5	33,33	
Bratislava	1	0	0	0	1	6,67	
Pyrogenes	0	0	0	1	1	6,67	
Total	7	3	2	3	15	100	

Não houve a quarta coleta, como havia sido planejado, em virtude da adoção do esquema de

vacinação anti-*Leptospira* em algumas vacas do rebanho, sem a prévia consulta a equipe executora deste trabalho. Como poderia haver erros de interpretação, visto que o método de diagnóstico SAM, não difere precisamente uma reação vacinal de uma infecção, optou-se por descartar a última coleta, mas continuou-se com a observação dos dados de produção e reprodutivos até o término de 2012.

A percentagem média de reagentes (48,34%) foi próxima à encontrada por Lilenbaum e Souza (2003), para o estado do Rio de Janeiro (46,9%) de 379 animais examinados, com 177 fêmeas infectadas. Oliveira et al. (2010), na Bahia, encontraram prevalência superior (77,93%) em 10.823 amostras.

25

As reações para mais de um sorovar foram encontradas em sete das 24 variantes sorológicas utilizadas, com títulos aglutinantes de 1:100 ou mais; Sejroe, com foi o sorogrupo mais frequente; predominou o sorovar Hardjo com 20,66% (25/121) seguido de Wolffi, com 19,00% (23/121).

Alguns sorovares considerados importantes para bovinos, como Pomona, Grippotyphosa e Pyrogenes, mostraram baixa prevalência (0,82%), ou nem sequer reagiram, o que é condizente com os achados de Araújo et al. (2005) em Minas Gerais e Lilenbaum et al. (1995) no Rio de Janeiro, que não encontraram nenhuma amostra reagente a esses sorovares.

O fato do sorovar Hardjo ter sido o mais frequente (20,66 %) está em conformidade com a maioria dos inquéritos sorológicos realizados em bovinos (ELLIS 1994; VASCONCELLOS et al., 1997; ARAÚJO et al., 2005; SILVA et al. 2011); tais inquéritos o consideram o causador de abortamentos nessa espécie, com evidências sorológicas em todo o mundo. Em oito estados brasileiros, Lilenbaum e Souza (2003) e Oliveira et al. (2010) encontraram o sorovar Hardjo como predominante.

O segundo sorovar mais prevalente foi Wolffi (19,00%), com títulos que variaram de 1:100 a 1:800, o qual estava presente nas três coletas deste trabalho. Juliano et al. (1999) e Araújo et al. (2005) encontraram 81,90%, 13,2% de positivos para esse sorovar, respectivamente. O sorovar Wolffi tem sido referido em inquéritos sorológicos nos Estados Unidos da América (MILLER et al., 1991) e no México (COVARRUBIAS e RUIZ, 1995); existe, todavia, a hipótese de que tais registros seriam resultados de reações cruzadas com o sorovar Hardjo, pois ambos estão incluídos no sorogrupo, Sejroe (FAINE, 1982) e, dessa forma, compartilham determinantes antigênicos. Saliente-se, por outro lado, que o critério empregado no presente estudo, com análise da relação frequência/título.

Quando analisa-se estatisticamente os resultados das três coletas para deste rebanhos, os sororagentes a *Leptospira interrogans*, não difere entre si, como demonstrado na tabela 6, cujos valores de significância estão descritos abaixo.

Tabela 6 Resultados do Teste do Qui-quadrado (nível de 5%), dos 49 animais sororeagentes a *Leptospira interrogans* no Campus de Pinheiral, Estado do Rio de Janeiro, de junho de 2011 a junho de 2012.

Titulação	Positivos	Negativos	Total	Valor p (IC 95%)
1a. coleta	24	22	46	0,51
2a. coleta	20	20	40	0,27
3a. coleta	15	20	35	0,34

26

4.2 Cálculo de Índices de Produtividade

Após a avaliação da produção leiteira, nos anos de 2011 a 2012, feitos a partir do controle leiteiro semanal, de todas as vacas do rebanho, foi em média de 692,4 Kgs. A produção média na época de seca foi de 87,8 kgs e de 443,8 kgs, das 39 fêmeas do rebanho.

Vale ressaltar que sete fêmeas foram descartadas do rebanho, durante 2011 a 2012, devido a problemas de aprumo, morte subita sem laudo definido, e substituídas em 2012 por novilhas, que foram examinadas para leptospirose, quando bezerras e agora após a primeira cria, permanecendo com nível de produção do rebanho. Portanto, estas alterações não puderam ser associadas ao quadro clínico de leptospirose bovina, durante este período de avaliação.

4.3 Cálculo dos Índices Reprodutivos

Os principais sinais clínicos atribuídos a leptospirose bovina levando as perdas econômicas, são: repetições de cio, infertilidade, mastites, abortamentos, bezerros prematuros, nascimento de bezerros fracos, mortes, decréscimo na produção de leite (FAINE et al., 1999), corresponde aos sinais clínicos na fase de bacteremia, e fase crônica por serem animais portadores assintomáticos, observa-se a queda na produção de leite.

Na tabela 7, estão registrados os principais distúrbios reprodutivos registrados nas fichas individuais do rebanho do Colégio Técnico de Pinheiral, 46,15% foram de repetições de cios, com períodos irregulares de 10 a 42 dias, o que corresponde a um erro de observação dos sinais de cio e a morte embrionária.

No ano de 2011, havia a cobertura por touro, principalmente nas fêmeas que repetiam cio após a inseminação, no ano de 2012 este touro foi retirado do rebanho, ficando apenas a inseminação. Os inseminadores passaram por uma reciclagem, demonstrando neste ano uma maior eficiência no índice

de concepção de três coberturas /prenhez, considerado um índice bom para o rebanho.

Tabela 7: Distúrbios reprodutivos do rebanho dos animais sororeagentes a *Leptospira interrogans* no Campus de Pinheiral, Estado do Rio de Janeiro.

Distúrbios reprodutivos	Frequência absoluta	Porcentagem (%)
Repetições de cios	24	46,15
Retenção de placenta	06	11,50
Morte embrionária	03	5,80
Aborto	08	15,40
Metrite	03	5,80
Vulvovaginite	06	11,50
Piometra	02	3,85

Quanto aos outros distúrbios registrados em fichas, de 15,40% de abortamentos, ocorreram aos quatro meses de gestação, principalmente no ano de 2011, quando havia a presença do ruo em monta natural, não foi diagnosticado *Tritrichomonas foetus*, mas estão sendo feitas novas coletas para concluir o agente causal destes abortos. A vulvovaginite presente pode ser atribuída a Rinotraqueite Infeciosa Bovina ou a *Mycoplasma sp.*, que foram registrados a ocorrência desta doença no rebanho.

Os casos de retenção de placenta, piometra e metrites pode ser atribuído ao manejo terapêutico empregado no rebanho. Na leitura das fichas, observa-se que é comum o uso de infusões intra-uterinas pós-parto, mesmo não havendo relato de partos distócicos, devido ao manuseio no útero pode favorecer a ocorrência destes distúrbios.

Quanto aos índices reprodutivos demonstrados na tabela 8, observa-se que os mesmos se encontram dentro da normalidade do rebanho nacional. Visto que no exame ginecológico as alterações observadas foram da ocorrência de cistos foliculares em duas fêmeas, que tem histórico de infertilidade e um intervalo de partos de 15 meses, mas a produção leiteira desta fêmea, fica dentro dos parâmetros do rebanho.

GENOVEZ et al. (2001), em um rebanho zebuino criado sob condições extensivas e climáticas brasileiras, observaram que a infecção pelo sorovar hardjo apresentou caráter crônico e endêmico, não causando efeito sobre a concepção e parição das matrizes, pode extrapolar estes resultados para

o gado leiteiro, visto que há uma suplementação de concentrado a estas vacas, segundo o mês de janeiro de 2013, foi de 4,2 kgs de ração: 1 litro de leite, o que possibilita um equilíbrio com a leptospirose, que provavelmente está endêmica no rebanho. O exame ginecológico das fêmeas durante o período de observação, indicou que as falhas reprodutivas comuns no rebanho devido as repetições de cio, ocorreu por falhas na detecção de cio e não devido a ocorrência de animais reagentes a *Leptospira interrogans*.

28

A comparação da performance reprodutiva entre vacas de leite reagentes e não reagentes ao sorovar hardjo foi efetuado por GUITIAN et al. (1999), que encontraram diferenças significativas, tais como redução da fertilidade do grupo infectado devida a um maior intervalo entre parto e concepção e maior número de coberturas por concepção, o que não foi comprovado neste estudo.

Tabela 8 Índices reprodutivos no rebanho do Campus de Pinheiral, Estado do Rio de Janeiro, de 2011 a 2012.

Índices reprodutivos	Resultados do rebanho (média)
Serviço por concepção	4 inseminações/prenhez
Período de serviço	60 a 90 dias
Intervalo de partos	12 a 14 meses
Índice de gestação	66,6 %
Índice de parição	60,0 %

4.4 Análise dos fatores de risco

Quanto aos fatores de risco analisados, o tamanho do rebanho foi considerado importante fator para a infecção por leptospirosas, pois demonstra o papel do bovino como disseminador de leptospirosas independente do tamanho do rebanho, mas da possibilidade de contato entre os animais e, neste aspecto, a densidade de cabeças por área de pastejo seria o facilitador na disseminação da infecção (GENOVEZ et al., 2004). A existência de piquetes maternidade surge como uma prática de manejo protetora contra a leptospirose.

Como as pastagens margeiam o Rio Paraíba é apontado como indicador de contato indireto para o rebanho, visto que há a possibilidade de contaminação de pastagens e de água por animais de outras propriedades. Sabe-se que o agente, uma vez presente no ambiente, pode permanecer viável por longos períodos, dependendo das condições de umidade, temperatura e sombreamento, aumentando de forma significativa a chance de contato e infecção de um novo indivíduo susceptível, conforme mencionaram Faine et al. (1999).

A introdução de animais nas propriedades pela compra de reprodutores sem exames prévios é relevante fator de risco, o qual está de acordo com falhas na sanidade de qualquer rebanho em que as práticas preventivas não são cumpridas. A substituição no ano de 2012, pela inseminação artificial, reduziu a ocorrência de abortamentos, os quais não foram ocasionados pela leptospirose, visto apresentava uma frequência de quatro meses.

29

O acompanhamento da produção mensal do leite, demonstrou que a incidência de animais reagentes a leptospirose, não influenciou na queda da produção, o que está diretamente ligado a qualidade da alimentação e suplementação mineral, que durante este período não declinou e constatou-se que a manutenção do escore corporal destes animais entre 3,5 a 4,0, possibilitou este resultado. Del Fava et al., 2004, observou-se que o bom estado nutricional dos animais foi um ponto favorável para a reprodução, pois tanto animais prenhes reagentes ou não reagentes para *Leptospira* spp. melhoraram a condição.

5. Conclusão

Neste rebanho, as matrizes soropositivas para *Leptospira*, quando bem manejadas semi-extensivamente e mantidas sob boas condições nutricionais, apresentaram bons coeficientes de prenhez, parição e natalidade, portanto não havendo interferência da doença sobre a produtividade do rebanho.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, D.M. *Prevalencia de anticorpos anti-Neospora caninum, anti-Brucella abortus e anti-Leptospira spp. Em bovinos da zona rural do municpio Monte Negro, Rondonia: estudos dos possíveis fatores de risco.* 2004, 120f. Dissertação (Mestrado), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

AGUIAR D.M., GENNARI S.M., CAVALCANTE G.T., LABRUNA M.B., VASCONCELLOS S.A., RODRIGUES A.A.R., MORAES Z.M.; CAMARGO L.M.A. Prevalência e fatores de risco para a leptospirose em bovinos do Mato Grosso do Sul prevalence of *Leptospira* spp. in cattle from Monte Negro municipality, western Amazon. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.26, n. 2, p.102-104, 2006.

ALONSO-ANDICOBERRY, C.; GARCÍA-PEÑA, F.J.; PEREIRA-BUENO, J.; COSTAS, E.; ORTEGA-MORA, L.M.; Herd-level risk factors associated with *Leptospira* spp. seroprevalence in dairy and beef cattle in Spain *Preventive Veterinary Medicine*, v. 52, n. 2, 3, p.109-117, 2001.

ALVES, C.J.; VASCONCELOS, S.A.; CAMARGO, C.R.A.; MORAIS, Z.M. Influencia de fatores ambientais na proporção de caprinos soro-reagentes para a leptospirose em cinco centros de criação do Estado da Paraíba. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 63, n. 2, p.11-18, 1996.

AMATREDJO, A.; CAMPELL, R.S.F. Bovine leptospirosis. *The Veterinary Bulletin*, v.45, n.12, p. 875-891, 1975

ARAÚJO V.E.M., MOREIRA E.C., NAVEGA L.A.B., SILVA J.A. & CONTRERAS R. Frequência de aglutininas anti-*Leptospira interrogans* em soro-sangüíneos de bovinos, em Minas Gerais, de 1980 a 2002. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia*, v. 57, n.4, p.430-435, 2005.

BHARTI A.R, NALLY J.E, RICARDI J.N et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infectious Disease*; v.3, p 757–771, 2003.

BRAGA, J.; HAMOND, C.; MARTINS, G.; ABREU, R.A.; LILENBAUM, W. Ophthalmic alterations in horses with leptospirosis by serovar Icterohaemorrhagiae in Rio de Janeiro, Brazil. *Pesquisa Vetereinária Brasileira*, v 31, n.2, p.147-150, 2011.

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

BRASIL, 2007, *Guia de Vigilância Epidemiológica, Leptospirose*. Brasília, Fundação Nacional Saúde, Ministério da Saúde, Brasília. p. 502-520, 2007.

BROD, C.S.; MARTINS, L.F.S; NUSSBAUM, J.R. et al., Leptospirose Bovina na região Sul do estado do Rio Grande do Sul. *A Hora Veterinaria*, v. 14, n. 84, p. 15-20, 1995.

CARVALHO NETA, A.; LAFETÁ, B. N.; MARCELINO, A. P. Leptospirose bovina: epidemiologia, diagnóstico e controle. Disponível em: <<http://www.beefpoint.com.br>>. Acesso em 12 de dezembro em 2012.

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

COLE JR. J.R; SULZER, C.R.; PURSELL, A.R. Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test. *Applied Microbiological*, v. 25, n. 6, p.976-980, 1973.

COLEMAN, T.J. The public health laboratory service and its role in the control of zoonotic disease. *Acta Tropica*, v. 76, n.1, p. 71-75, 2000.

CORTES, J.A. *Epidemiologia: conceitos e princípios fundamentais*. Ed. Varela, São Paulo, 1993, 277p.

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.

COVARRUBIAS, A.C.; RUÍZ, V.M.B. Seroprevalencia de leptospirosis bovina en tres municipios del sur de Tamaulipas. *Tecnico Pecuaria México*, v.33, p.121-124, 1995.

DEL FAVA, C. et al. Manejo sanitário para o controle de doenças da reprodução em um sistema leiteiro de produção semi-intensivo. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.70, n.1, p.25-33, 2003.

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 Vetereinary*, v. 20, n.1, p.52-61, 2004.

ELLIS, W. A.; O'BRIEN, J. J.; NEILL, S. D.; HANNA, J. Bovine leptospirosis: Serological findings in aborting cows. *Veterinary Record*, v.110, p.178-180, 1982.

ELLIS WA, O'BRIEN JJ, CASSELLS JA et al. Excretion of *Leptospira interrogans* serovar hardjo following calving or abortion. *Research Veterinary Science*, v. 39, p.296–298, 1985.

ELLIS WA, MCPARLAND PJ, BRYSON DG et al. Isolation of leptospires from the genital tract and kidneys of aborted sows. *Veterinary Record*, v.1, p. 294–295, 1986.

ELLIS W.A., MCPARLAND P.J., BRYSON D.G. et al. Boars as carriers of leptospires of the Australis serogroup on farms with an abortion problem. *Veterinary Record*, v.118, p. 563, 1986.

ELLIS WA, THIERMANN AB. Isolation of *Leptospira interrogans* serovar Bratislava from sows in Iowa. *American Journal Veterinary Research*, v. 47, p. 1458–1460, 1986.

ELLIS, W.A.; MONTCOMERI, J.M.; MCPARLAND, P.J. An experimental study with a *Lepstopira interrogans* serovar bratislava vaccine. *Veterinary Record*, v.125, p.319-321, 1989.

ELLIS, W.A. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v.10, n.3, p.463-478, 1994.

ELLIS W.A, YAN K.T, MCDOWELL S.W.J. et al. Immunity to bovine leptospirosis. *Proceedings of 21st World Buiatrics Congress*, p.10601–10611, 2000.

FAINE, S. Guidelines for the control of Leptospirosis, 2nd ed. World Health Organization, 1982.

FAINE, S. *Leptospira and leptospirosis*. Melbourne : CRC, 1994. 353p.

FAINE, S. et al. *Leptospira and leptospirosis*. 2.ed. Melbourne : MedSci, 1999. 272p.

FAVERO, A.C.M. et al. Aglutininas pós-vacinais em bovinos imunizados com bacterina tetravalente contra leptospirose. *Arq Inst Biol*, São Paulo, v.64, n.2, p.45-55, 1997.

GALTON M.M.; SULZER, C.R; SANTAROSA, C.A.; FIELDS, M.J. Application of a microtechnique to the agglutination test for Leptospiral antibodies. *Applied Microbiology*, v. 13, n. 1, p. 81-85, 1965.

GENOVEZ M.E., OLIVEIRA J.C., CASTRO V., FERRARI C.I.L., SCARCELLI E., CARDOSO M.V., PAULIN L.M. & LANCA NETO P. Serological profile of a nelore herd presenting endemic leptospirosis and submitted to vaccination. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.1, n.4, p.411-416, 2004.

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.107-112, 1993.

GIORGI, W. ; TERUYA, J.M.; SILVA, A.S. et al. Leptopirose: Resultados das soroaglutinações realizadas no Instituto Biológico de São Paulo durante os anos de 1974/1980. *Biológico*, v.47, p.109-118. 1981.

GIRIO R.J.S., MATHIAS L.A. Ocorrência de leptospirose em rebanhos bovinos produtores de leite tipo B na região Norte do Estado de São Paulo. *Ciências Veterinárias*, v. 3, p.3-5, 1989.

GUIMARÃES, M. C. *Epidemiologia e controle da leptospirose em bovinos. Papel do portador e o seu controle terapêutico*. 1982, 50p. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada a Zoonoses) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1982.

GUIMARÃES, M.A., CÔRTEZ, J.A., VASCONCELLOS, S.A., ITO, F.H. *Epidemiologia e controle da leptospirose em bovinos. Papel do portador e seu controle terapêutico*. Comunicações Científicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, v.6/7, n.1-4, p.21-34, 1982/1983.

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

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

JULIANO R.S., CHAVES N.S.T., SANTOS C.A., RAMOS L.S., SANTOS H.Q.,V; 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.

JOUGLARD, S.D.D.; BROD, C.S. Leptospirose em cães: Prevalência e fatores de risco no meio rural do município de Pelotas, RS. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.67, p.181-185, 2000.

LACERDA, L.M.; GIRIO, R,J,S,; MARCHIORO FILHO, M.; MATHIAS, L.A. Pesquisa de aglutininas contra *Leptospira interrogans* sorovar wolffi nos soros sanguíneo e lácteo de bovinos em diferentes fases do período de lactação. *Ars Veterinaria*, v.18, n.3, p.294-299, 2002.

LANGONI H., DEL FAVA C., CABRAL K.G., SILVA A.V. ;CHAGAS S.A.P. Aglutininas anti-leptospíricas em búfalos do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo. *Ciência Rural*, v. 29, p.305-307, 1999.

LANGONI, H., SOUZA, L.C., SILVA, A.V., LUVIZOTTO, M.C.R., PAES, A.C., LUCHESI, S.B. Incidence of leptospiral abortion in Brazilian dairy cattle. *Preventive Veterinary Medicine*, v.40, n.3-4, p.271-275, 2000.

LEONARD, F.C.; QUINN, P.J.; ELLIS, W.A.; O'FARRELL, K. Duration of urinary excretion of leptospirres by cattle natrally or experimentally infected with *Leptospirra interrogans* serovar hardjo. *Veterinary Record*, v.7, p. 435-39, 1993.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. *Clinic Microbiology Review*, v.14, p.196–326, 2004.

LEVETT, P.N. Leptospirosis: A forgotten zoonosis? *Clinical and Applied Immunology Reviews*, p. 435–448, 2001.

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

LILENBAUM, W. Atualização em leptospiroses bovinas. *Revista Brasileira de Medicina Veterinaria*, v.18, n.1, p.9-13, 1996.

LILENBAUM W. ; SOUZA G.N. Factors associated with bovine leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Research Veterinary Science*, v.75, p.249-251, 2003.

LILENBAUM W.; SANTOS M.R.C. Effect of management systems on the prevalence of bovine leptospirosis. Rio de Janeiro. *Veterinary Record*, v.138, n.23, p.570-571. 1996.

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

MELO, L.E.H. *Avaliação da intecorrência entre leucose enzootica, tuberculose e leptospirose dos bovinos em rebanhos produtores de leite tipo C. do estado de São Paulo*, 1999, 127p. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

MINEIRO, A.L.B.B; VIEIRA, R.J.; FEITOSA, L.C.S. et al., Pesquisa de sorovares de Leptospiras em rebanho bovino leiteiro no estado do Piauí, Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.77, n.1, p.129-132, 2010.

MOREIRA E.C.; SILVA, J.C; VIANA, F.C; SANTOS, W.L.W; ANSELMO, F.P. Leptospirose bovina. I. Aglutinas anti-leptospiras em soros sanguíneos de bovinos de Minas Gerais. *Arquivos da Escola de Veterinaria da UFMG*, v.31, n.3, p. 375-388, 1979.

MOREIRA E.C. *Avaliação de métodos para erradicação de leptospiroses em bovinos leiteiros*. Tese de Doutorado em Medicina Veterinária, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 93p., 1994.

MORIKAWA, V.M. *Estudo sorológico da infecção por Leptospira spp. em uma área de ocupação irregular e de alto risco para a doença em cães em Curitiba, Paraná*. Dissertação (Mestrado) Programa de PósGraduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Sanidade Animal e Medicina, Universidade Federal do Paraná, 2010, 72p.

MYERS, D.M. *Manual de métodos para el diagnóstico de laboratorio de la leptospirosis*. Centro Panamericano de Zoonosis, 1985, n.46.

NIANG M., WILL L.A., KANE M., DIALLO A.A.;HUSSAIN M. Seroprevalence of leptospiral antibodies among dairy cattle kept in communal corrals in periurban areas of Bamako, Mali, West Africa. *Preventive Veterinary Medicine*, v.18, p.259-265, 1994.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). Leptospirosis, Chapter 2.2.4. World Organisation for Animal Health. Disponível em: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/_00043.htm. Acesso em 16.10.2012.

OLIVEIRA, S.J. Presença de aglutininas antileptospiras em suínos e bovinos, com e sem sinais de infecção, no Rio Grande do Sul. *Boletim do IPVDF*, v.4, p.57-64, 1977.

PITUCO. E.M.; DEL FAVA, C. Causas infecciosas de mortalidade embrionária e fetal em bovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 27, n. 2, p. 68-75, 2003.

QUINN, P.J. et al. *Clinical veterinary microbiology*. Madri: Grafos, 1994. 648 p.

RADOSTITS O.M., BLOOD D.C. Planejamento da saúde e produção animal nos rebanhos de bovinos de corte. In: Radostits O.M. & Blood D.C., ed., *Manual de controle da saúde e produção dos animais*. São Paulo, Manole, 2000. p.233-281.

RENDE; J.C.; AVILA, F.A. Leptopirose bovina perfil epidemiológico e dinâmica de infecção como zoonose, *Ars Veterinária*, v. 19, n.1, p. 71-79, 2003.

RIBEIRO S.C.A., BOSCOLO I.B., GONÇALVES G.F. ; OLIVEIRA P.R. 1999. Leptospirose no rebanho bovino da subregião de Nhecolândia, Pantanal matogrossense, Brasil. *Veterinaria. Notícias*, Uberlândia, v. 5, n. 1, p.51-55, 1999.

RODRIGUES C.G., MULLER E.E.; FREITAS J.C. Leptospirose bovina: sorologia na bacia leiteira da região de Londrina, Parana, Brasil. *Ciência Rural*, v. 29, n.2, p.:309-314, 1999.

SAMPAIO I.B.M. *Estatística Aplicada à Experimentação Animal*. Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte. 221 p, 2000.

SANTA ROSA, C.A.; CASTRO ,A.F.P.; SILVA, A.S.; TERUYA, J.M. Nove anos de leptospirose no Instituto Biológico. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, v.29/30, p.19-27, 1969/1970.

SANTA ROSA, C.A. Diagnóstico laboratorial das leptospiroses. *Revista de Microbiologia*, v.1, p.97-109, 1970.

THRUSFIELD, M. *Veterinary Epidemiology*. London Butterwortes, 1986, 280p.

VASCONCELLOS, S.A., BARBARINI JÚNIOR, O., UMEHARA, O., MORAIS, Z.M., CORTEZ, A., PINHEIRO, S.R., FERREIRA, F., FÁVERO, A.C.M., FERREIRA NETO, J.S. Leptospirose bovina. Níveis de ocorrência e sorotipos predominantes em rebanhos dos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul. Período de janeiro a abril de 1996. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.64, n.2, p.7-15, 1997.

VASCONCELLOS S.A. 2009. Soroprevalência de leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no estado da Bahia. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 76, n.4, p.539-546, 2009.