

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

Título:

Isolamento de *Leptospira* spp. a partir do trato geniturinário de ovinos abatidos no Matadouro Público de Patos, Estado da Paraíba, Brasil.

Severino Silvano dos Santos Higino

2007



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

Título:

Isolamento de *Leptospira* spp. a partir do trato geniturinário de ovinos abatidos no Matadouro Público de Patos, Estado da Paraíba, Brasil

Autor:

Severino Silvano dos Santos Higinio

Orientador:

Dr. Clebert José Alves

Área de concentração:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Patos, junho de 2007



Biblioteca Setorial do CDSA. Junho de 2022.

Sumé - PB

FICHA CATALOGADA NA BIBLIOTECA SETORIAL DO
CAMPUS DE PATOS - UFCG

H638I

2007

Higino, Severino Silvano dos Santos.

Isolamento de *Leptospira* spp. A partir do trato geniturinário de ovinos abatidos no Matadouro Público de Município de Patos, Estado da Paraíba, Brasil / Severino Silvano dos Santos Higino. – Patos: CSTR/UFCG, 2007.

44 p.: il.

Inclui bibliografia.

Orientador: Clebert José Alves.

Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) – Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande.

1 – Epidemiologia - Projeto de pesquisa– Monografia. I - Título

CDU: 616 - 036.22:619

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

ALUNO:

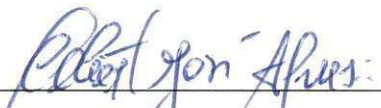

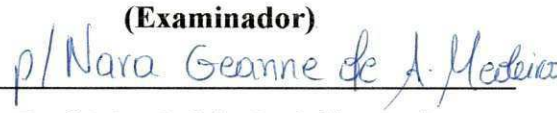
SEVERINO SILVANO DOS SANTOS HIGINO

Monografia submetida ao Curso de Medicina Veterinária como requisito
parcial para a obtenção do grau de Médico Veterinário.

APROVADO EM...../...../.....

MÉDIA:.....

BANCA EXAMINADORA

| | |
|---|-------------------|
|  _____ Prof. Dr. Clebert José Alves (Orientador) | Nota: <u>10,0</u> |
|  _____ Prof. Dr. Sérgio Santos de Azevedo (Examinador) | Nota: <u>10,0</u> |
|  _____ Prof. Msc. Inácio José Clementino (Examinador) | Nota: _____ |

“Se todos os seus esforços forem vistos com indiferença, não desanime... Porque também o sol, ao nascer, dá um espetáculo todo especial e, no entanto a maioria da platéia continua dormindo”.

(Anônimo)

DEDICATÓRIA

- Aos meus pais, Severino Heleno Higino e Severina dos Santos Higino, que sempre estiveram ao meu lado, me ensinaram a ter caráter e honestidade, sendo a minha fortaleza e o meu porto seguro, a quem tanto amo e me orgulho.
- À minha irmã Maria Higino e meu cunhado Josimar Rangel, pelas pessoas que são e por serem exemplos para mim.
- A Universidade Federal de Campina Grande, que tanto me orgulho de fazer parte.

A vocês, minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

- Ao criador do universo, por ter crescido onde cresci, ser filho de quem sou e pela oportunidade de me tornar Médico Veterinário.
- A todos os Professores da Universidade Federal de Campina Grande, especialmente ao meu orientador Prof. Dr. Clebert José Alves, pela enorme contribuição na minha formação profissional e realização deste trabalho.
- Aos amigos, especialmente a Hudson, João Marcos, Salomão, Hyago e Gilmar.
- Aos amigos, Vasconcelo Salustiano de Sousa, José Bernardo Alves e Ricardo Franklin Dutra Linhares pelo auxílio prestado na fase final do projeto.
- A todos os funcionários da UFCG, especialmente a Iolanda, Dona Francinete, Tereza e Damião, pela amizade e convivência.
- A grande amiga Jucileide Barboza Borburema, pelo apoio, fraternidade, companheirismo e paciência.
- A minha namorada Andrezza Klyvia pelo exemplo de força e determinação a quem tanto estimo e me orgulho, assim como todas as pessoas que me ampararam nos meus momentos mais difíceis, me ajudaram a superar obstáculos e me ensinaram a nunca desistir diante das dificuldades.

A todos muito obrigado.

LISTA DE QUADROS E TABELAS

- Quadro 1.** Sorovares de Leptospiras empregados como antígeno na técnica de soroaglutinação microscópica aplicada à leptospirose em ovinos abatidos no matadouro público do município de Patos – PB no período de 2005/2006. Patos – PB, 2007..... 31
- Tabela 1.** Descrição das coletas segundo a data e o número de amostras para o isolamento, obtidas a partir do trato geniturinário de ovinos abatidos no matadouro público do município de Patos – PB no período de 2005/2006. Patos – PB, 2007..... 26
- Tabela 3.** Frequência dos soros de ovinos abatidos no Matadouro Público do município de Patos – PB no período de 2005/2006. Reagentes pela técnica de soroaglutinação microscópica aplicada a leptospirose segundo o sorovar e seus respectivos títulos, Patos – PB, 2007..... 33
- Tabela 2.** Amostras positivas para o isolamento e para o teste de soroaglutinação microscópica aplicada a leptospirose realizado nos soros sanguíneos de ovinos abatidos no matadouro público do município de Patos – PB no período de 2005/2006. Patos – PB, 2007..... 32

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------------|---|----|
| Figura 1. | Microscopia eletrônica demonstrando a estrutura de uma leptospira | 17 |
| Figura 2. | Anel de turvação em meio de cultura de Fletcher, indicando o crescimento de <i>Leptospira</i> spp. | 29 |
| Figura 3. | Amostra negativa na SAM..... | 31 |
| Figura 4. | Amostra positiva na SAM..... | 31 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| RESUMO | 11 |
| ABSTRACT | 12 |
| | |
| 1 INTRODUÇÃO | 13 |
| | |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 16 |
| 2.1 Agente Etiológico..... | 16 |
| 2.2 Aspectos epidemiológicos | 17 |
| 2.3 Patogenia..... | 19 |
| 2.4 Sinais Clínicos..... | 19 |
| 2.5 Patologia..... | 20 |
| 2.6 Diagnóstico..... | 21 |
| 2.6.1 Diagnóstico Clínico..... | 21 |
| 2.6.2 Diagnóstico Sorológico..... | 22 |
| 2.6.3 Exame em microscopia de campo escuro..... | 23 |
| 2.6.4 Inoculação em animais de Laboratório..... | 23 |
| 2.6.5 Reação de polimerase em cadeia..... | 23 |
| 2.7 Tratamento..... | 24 |
| 2.8 Controle e profilaxia..... | 24 |
| | |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 25 |
| 3.1 Animais..... | 25 |
| 3.2 Amostras..... | 25 |
| 3.2.1 Trato geniturinário..... | 25 |
| 3.2.2 Soros Sangüíneos..... | 25 |
| 3.3 Meios de Cultura..... | 26 |
| 3.3.1 Meio semi-sólido de Fletcher..... | 26 |
| 3.3.2 Meio de Ellinghausen, Mccullough, Jhonson e Harris (EMJH)..... | 27 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.4 | Diluyente..... | 27 |
| 3.4.1 | Preparo da solução salina fisiológica..... | 27 |
| 3.4.2 | Preparo da solução tamponada de Sorensen..... | 27 |
| 3.4.3 | Preparo da solução salina tamponada de Sorensen estéril..... | 28 |
| 3.5 | Isolamento de Leptospiras em meios de cultura..... | 28 |
| 3.6 | Leituras macro e microscópica..... | 29 |
| 3.6.1 | Leitura macroscópica..... | 29 |
| 3.6.2 | Leitura microscópica..... | 29 |
| 3.7 | Técnica de soroaglutinação microscópica..... | 30 |
| 3.7.1 | Descrição da técnica..... | 30 |
| 4 | RESULTADOS..... | 32 |
| 5 | DISCUSSÃO..... | 34 |
| 6 | CONCLUSÕES..... | 36 |
| 7 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 37 |

RESUMO

HIGINO, SEVERINO SILVANO DOS SANTOS. Isolamento de *Leptospira* spp. A partir do trato geniturinário de ovinos abatidos no Matadouro Público de Patos, Estado da Paraíba, Brasil. Patos, UFCG. 2007 44p. (Monografia – Curso de Medicina Veterinária, Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal).

A leptospirose é uma enfermidade amplamente difundida no Brasil que acarreta elevados prejuízos econômicos para a pecuária nacional. O seu principal impacto é o comprometimento do desempenho reprodutivo dos rebanhos acometidos. O presente estudo teve como objetivo o isolamento de leptospirosas patogênicas em meios de cultura a partir do trato geniturinário de ovinos, comparando os resultados obtidos com o perfil sorológico dos animais pesquisados. Foram processadas 80 amostras do trato geniturinário de fêmeas e machos (placenta, ampola do ducto deferente, glândulas vesiculares) abatidos no matadouro público de Patos – PB, Brasil e, paralelamente, foram realizados testes sorológicos visando encontrar aglutininas anti-leptospirosas. Para o isolamento da bactéria a partir de fragmentos dos órgãos coletados, foi utilizada a inoculação em meio de cultura (Fletcher). Os resultados encontrados indicaram duas amostras positivas, dentre as pesquisadas. As amostras suspeitas foram purificadas sendo inoculadas em animais de laboratório. O diagnóstico sorológico da leptospirose foi realizado pela soroaglutinação microscópica, utilizando-se 17 sorovares. Para o teste de soroaglutinação microscópica, seis animais foram positivos com soros reagentes aos sorovares Autumnalis e Icterohaemorrhagiae. Entre as amostras positivas para o isolamento, nenhum animal foi sorologicamente positivo ao teste de soroaglutinação.

Palavras-chave: Isolamento, *Leptospira* spp, Trato geniturinários, ovinos.

ABSTRACT

HIGINO, SEVERINO SILVANO DOS SANTOS. isolation of *Leptospira* spp. starting from the geniturinary apparel of sheeps depressed in the Public Slaughterhouse of Patos, State of Paraíba, Brazil. Patos, UFCG. 2007 44p. (Monograph- Veterinary Medicine, Preventive Veterinary Medicine and Animal Health).

The leptospirosis is an illness thoroughly spread in Brazil that carts high economical damages for the national livestock. His/her main impact is the compromising of the reproductive acting of the attacked flocks. The present study had as objective the isolation of leptospiras pathogenic in culture means starting from the treatment sheep genitourinary, comparing the results obtained with the profile serologic of the researched animals. 80 samples of the treatment genitourinary of females and males were processed (placenta, flask of the deferential duct, vesicular glands) abated at the public slaughterhouse of Patos - PB, Brazil and, parallel, tests serologic were accomplished seeking to find antibodies of leptospirosis. For the isolation of the bacterium starting from fragments of the collected organs, the inoculation was used in middle of culture (Fletcher). The found results indicated two positive samples, among researched them. The suspicious samples were purified being inoculated in laboratory animals. The diagnosis serologic of the leptospirosis was accomplished by the microscopic soroaglutinação, being used 17 sorovares. For the test of microscopic soroaglutinação, six animals were positive with serums reagents to the sorovares Autumnalis and Icterohaemorrhagiae. Among the positive samples for the isolation, no animal was positive serologically to the soroaglutinação test.

Keywords: Isolation, *Leptospira* spp, geniturinary apparel, sheep.

1 INTRODUÇÃO

Sem dúvida, a caprinovinocultura tem valor destacado no meio rural da região Nordeste do Brasil. Entre os fatores responsáveis pela baixa produtividade no rebanho caprino e ovino, uma parcela de 10% tem sido atribuída ao abortamento, cujas principais causas são de origem sanitária e nutricional (SILVA & SILVA., 1983).

Dentre as doenças ou infecções naturalmente transmissíveis entre os animais e o homem (ABDUSSLAM, 1975) a leptospirose tem assumido grande importância tanto nos países em desenvolvimento quanto nos desenvolvidos, afetando a saúde animal (TURNER, et al., 1970), a economia da produção e a saúde pública, como também a disponibilidade de proteína para a população necessitada (ABDUSSLAM, 1975; BLENDEN, 1976; DAVIDSON, 1971; FAINE, 1982; SZYFRES, 1975).

A ocorrência da leptospirose é variável em diferentes partes do mundo, podendo-se observar tanto a forma esporádica quanto a endêmica. Os surtos se produzem por exposição à água contaminada com urina ou tecidos provenientes de animais infectados (SILVA et al., 1983).

Nas regiões tropicais e subtropicais, as taxas de ocorrência de leptospirose são maiores do que as observadas nas regiões frias. Particularmente nas ocasiões em que ocorrem elevados índices de precipitações pluviométricas e nas regiões em que o solo apresenta reação neutra ou levemente alcalina, associando-se ainda a variedade de espécies hospedeiras que facilitam a cadeia de eventos necessários para a transmissão da leptospirose (BLENDEN, 1976; OKAZAKI & RINGER, 1957).

O modelo de evolução da infecção onde a leptospirose se estabelece após uma fase aguda com sintomatologia evidente caracteriza a modalidade de fonte de infecção referida como "portador convalescente". No entanto, em surtos de leptospirose nos rebanhos de interesse econômico é comum a existência de indivíduos que apresentam uma fase aguda assintomática no período de leptospirose, inclusive sem demonstrar a presença de anticorpos. Essa última situação representa a modalidade de fonte de infecção definida como "portador são", que pela dificuldade em sua identificação apresenta ainda maior importância em termos de saúde animal e de saúde pública (VASCONCELLOS, 1987).

Animais em lactação podem eliminar leptospirose no leite na fase aguda da doença. (MANUAL DE CONTROLE DA LEPTOSPIROSE, 1989).

A leptospirose é uma enfermidade amplamente difundida no Brasil que acarreta elevados prejuízos econômicos para a pecuária nacional. O seu principal impacto é o comprometimento do desempenho reprodutivo dos rebanhos acometidos (VASCONCELLOS, 1993). O controle da leptospirose envolve aplicação de medidas que incluem a identificação das fontes de infecção, a eliminação do excesso de água do ambiente e a imunização sistemática dos suscetíveis, com vacinas inativadas que contenham os sorotipos de leptospiras presentes na região (GUIMARÃES., 1982).

A infecção de ovinos e caprinos por microorganismos do gênero leptospira pode manifestar-se sob a forma aguda, crônica ou inaparente (CACCHIONE, R.A. et al., 1963; BEAMER, P.D.H et al., 1953). Esta última é muito mais freqüente do que as outras e desperta pouca atenção dos pesquisadores devido à dificuldade no diagnóstico (RAFYI, et al., 1967). No entanto, do ponto de vista epidemiológico, é uma forma muito importante, uma vez que, a introdução de animais com infecção inaparente possa garantir a persistência do agente nos rebanhos acometidos (BLENDEN, 1976; TORTEN, 1979). A forma inaparente é a mais comum, dificultando com isso, o diagnóstico clínico e epidemiológico. Nessas espécies, o aborto é considerado a manifestação mais freqüente nos casos agudos da doença (DAVIDSON, 1971).

A prevalência da leptospirose em rebanhos ovinos e caprinos pode depender da presença de alguns sorovares que afetam outras populações de animais (DAVIDSON, 1971; SMITH, et al., 1986). Em determinadas regiões, diferentes sorotipos de leptospiras são prevalentes e estão associados a um ou mais hospedeiros de manutenção, ou reservatórios. Esses reservatórios podem ser representados por animais domésticos e silvestres. Espécies silvestres amplamente distribuídas pelo território brasileiro como o roedor silvestre *Galea spixii* (Preá) têm sido identificadas como portadores de leptospiras, o que representa um alto potencial de infecção para os animais domésticos. É amplamente aceito que os roedores silvestres desempenham um importante papel na epizootologia da leptospirose, uma vez que estes animais atuam como disseminadores do agente etiológico (LINS & LOPES, 1984).

As condições do meio ambiente favorecem a transmissão e também a manutenção das Leptospiras no rebanho. Embora exista a tendência de se relacionar as altas precipitações com a ocorrência das doenças, esta condição não é necessária para

manutenção do agente e sua transmissão, mesmo em áreas áridas, basta apenas a introdução do portador no rebanho (TURNER, 1970).

A complexidade e o custo dos métodos de isolamento de patógenos em sistemas biológicos representados por animais de laboratório têm estimulado o desenvolvimento de técnicas que permitam a replicação de microorganismos em meios de cultura especiais (FAINE, 1982). Tal conduta, além de ser econômica é mais estável do que o uso de animais de laboratório.

O isolamento de leptospiras exerce um papel de relevância indiscutível no controle da enfermidade, pois permite o conhecimento exato dos diferentes sorotipos existentes em determinada região.

Alguns cuidados fundamentais devem ser observados para que haja sucesso no isolamento de *Leptospira* spp. Dentre eles podemos destacar: coleta e utilização de materiais assépticos, rapidez entre a coleta e o processamento da amostra, meios de cultura específicos e convenientes para o isolamento da bactéria, uso de antibióticos seletivos. Os microorganismos contaminantes tornam o isolamento difícil, pois multiplicam-se depressa e, por conseguinte, impedem o crescimento de leptospiras (FREITAS et al., 2004).

Deste modo, o objetivo do presente trabalho foi isolar leptospiras patogênicas a partir do trato geniturinário de ovinos abatidos no Matadouro Público do município de Patos, Estado da Paraíba. Através do cultivo em meios de cultura específicos, comparando os resultados encontrados com o perfil sorológico dos animais estudados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Agente Etiológico

O agente etiológico da leptospirose pertence à ordem *Spirochaetales*, família *Leptospiraceae* e gênero *Leptospira*. Segundo a classificação taxonômica clássica, com base em sorogrupos e sorovares e na patogenicidade, as leptospirosas podem ser divididas em dois grandes grupos: patogênicas e saprófitas. As patogênicas que infectam os humanos são: *Leptospira Interrogans*, *L. Borgpetersenii*, *L. Inadai*, *L. kirschneri*, *L. Noguchii* e *L. Santarosai*; possuem cerca de 202 sorovares agrupados em 23 sorogrupos. As espécies saprófitas de vida livre são: *L. Biflexa*, *L. Wolbachii*; possuem 38 sorovares agrupados em seis sorogrupos, sendo encontradas principalmente em água doce, e existindo raros registros de infecção nos seres humanos e nos animais (QUINN et al., 1994; FAINE et al., 1999; ACHA & SZYFRES, 2003)

As leptospirosas são bactérias espiraladas, muito finas (0,1 µm de diâmetro) e comprimento variando de 6 a 20 µm, tendo uma ou as duas extremidades em forma de gancho (figura 1). São aeróbicas estritas, de multiplicação e crescimento lentos, com divisão celular em torno de sete a doze horas. Uma cultura em meio líquido leva cinco a sete dias para atingir crescimento para ser utilizada como antígeno (BEER, 1999; FAINE, et al., 1999). São bastante sensíveis à luz solar direta, aos desinfetantes comuns e aos anti-sépticos. O período de sobrevivência das leptospirosas patogênicas na água varia segundo a temperatura, o pH, a salinidade e o grau de poluição. Sua multiplicação é ótima em pH compreendido entre 7,2 a 7,4. Já foi constatada, por meio de ensaios experimentais, a persistência de leptospirosas viáveis em água por até 180 dias (LANGONI, 1999). No meio ambiente sobrevivem bem em terrenos úmidos, pântanos, córregos, lagos e estábulos com excesso de umidade e de detritos. São muito sensíveis ao pH ácido e à dissecação (FAINE et al., 1999).



Figura 1. Microscopia Eletrônica demonstrando uma Leptospira.

Fonte: FAINE, 2004

2.2 Aspectos epidemiológicos

A leptospirose é uma zoonose com forte significado sócio-econômico-cultural. O crescimento desordenado dos grandes centros urbanos, as migrações e as deficiências nas condições de saneamento básico são fatores que contribuem para a difusão da doença. Além disso, o acúmulo desordenado de lixo promove a expansão da população de roedores, que terão sua urina disseminada pelas enchentes, favorecidas entre outras coisas, pela obstrução dos cursos d'água e canais e pela impermeabilização das vias públicas (CÔRTEZ, 1993). Dessa forma, entende-se porque a doença assume grande importância em países subdesenvolvidos, onde são freqüentemente encontradas condições precárias de trabalho e moradia, que maximizam a oportunidade de transmissão da doença (CORRÊA et al. 1982).

A persistência do agente no meio e o elevado potencial de infecção são assegurados por diversos fatores, tais como: a diversidade de sorovares, a multiplicidade de espécies hospedeiras que podem albergá-los e o relativo grau de sobrevivência no ambiente sem parasitismo, desde que haja elevado grau de umidade, proteção contra raios solares, temperaturas adequadas (em torno de 20°C) e valores de potencial hidrogeniônico (pH) neutro ou levemente alcalino, em torno de 7,2 a 7,4. Entretanto, as leptospiros patogênicas não se multiplicam fora do organismo dos hospedeiros (VASCONCELLOS, 1993).

O perfil epidemiológico da leptospirose, estreitamente associado à paisagem, aponta para a história natural de uma doença de ocorrência endêmica, restrita a focos naturais bem definidos e com picos epidêmicos em circunstâncias que envolvem alterações desordenadas do sistema ecológico. Essas alterações são provocadas pelo homem, que ao avançar sobre novos ecossistemas, provoca profundas transformações na paisagem natural,

permitindo a disseminação das leptospiras a novas áreas e a novos hospedeiros, até atingir a população humana (MASCOLLI, 2001).

As observações epidemiológicas têm indicado que esses agentes se mantêm circulando na população de hospedeiros primários, usualmente roedores selvagens, a partir dos quais alcançam outras populações de animais sinantrópicos e/ou domésticos. Estes são os hospedeiros secundários e acidentais. Neste sentido, a concentração de grandes efetivos de animais domésticos, como os rebanhos bovinos, pode ter como consequência à criação de amplas cadeias infecciosas, que contribuem para a disseminação do agente no meio ambiente e atuam como fator de risco para o homem (CÔRTÊS, 1993).

O modelo de evolução da infecção onde a leptospirúria se estabelece após uma fase aguda com sintomatologia evidente caracteriza a modalidade de fonte de infecção referida como “portador convalescente”. No entanto, em surtos de leptospirose nos rebanhos de interesse econômico, é comum a existência de indivíduos que apresentam uma fase aguda assintomática e um período de leptospirúria sem demonstrar a presença de anticorpos. Essa última situação representa a modalidade de fonte de infecção definida como “portador são”, que pela dificuldade em sua identificação, apresenta ainda maior importância em termos de saúde animal e pública (VASCONCELLOS, 1987).

A leptospirose acomete, praticamente, todos os animais domésticos, silvestres e o homem, provocando ou não a manifestação de sinais. Animais de muitas espécies domésticas, bem como a maioria das espécies silvestres, podem tornar-se portadores e contribuir para a disseminação do microorganismo na natureza. A eliminação da leptospira pela urina dos portadores ocorre por períodos de tempo que podem variar de poucas semanas a vários meses, entre os animais domésticos, e por toda vida no caso dos roedores (GIRIO et al., 2004).

Teoricamente os ovinos, como qualquer outra espécie, pode ser infectada por qualquer sorovar de leptospira, dependendo da situação epidemiológica do rebanho. Entretanto a leptospirose clinicamente aparente em ovinos está associada a alguns sorovares como Pomona, Grippotiphosa, Icterohaemorrhagiae, Serjoe e Hardjo (LÉON-VIZCAINO et al., 1987; ANDREANI et al., 1974; ELLIS et al., 1983).

Os ovinos são os animais domésticos considerados menos susceptíveis, porém sofrem a infecção das leptospiras patogênicas e em muitos casos, a evolução é assintomática, podendo, às vezes, ocorrerem surtos da doença com aborto e morte de cordeiros (CICCERONI et al., 2000).

2.3 Patogenia

Após a penetração, as leptospiras disseminam-se pela corrente circulatória e inicia-se o processo de multiplicação no sangue e em diversos órgãos, como fígado, baço e rins. Esta fase é chamada de leptospiremia, que tem uma duração de quatro a cinco dias, raramente superando sete dias. Com o progredir da infecção, ocorre a reação imunitária do hospedeiro, que antagoniza o agente invasor e faz com que o mesmo encontre refúgio em algumas áreas do organismo onde a imunidade humoral inexistente ou é verificada em níveis baixos. Tais locais são a câmara do globo ocular e a luz dos túbulos renais. A localização renal caracteriza a fase de leptospirúria, que tem início entre o sétimo e o décimo dia da evolução da doença. Nesta fase, ocorre a formação de complexos imunes e reação inflamatória, o que leva vários órgãos a uma vasculite generalizada, principalmente no fígado, rins, coração, pulmões e sistema reprodutivo (VASCONCELLOS, 1987; FAINE, et al., 1999).

A colonização renal ocorre na maioria dos animais infectados em virtude do agente se replicar e persistir nas células epiteliais dos túbulos renais onde os anticorpos ocorrem em baixos níveis. O comprometimento agudo da função renal pode resultar na diminuição da filtração glomerular causada pelo edema intersticial e diminuição da perfusão renal. (GREENE & SHOTTS, 1990).

2.4 Sinais Clínicos

A forma superaguda caracteriza-se por leptospiremia massiva e morte. Febre (39,5 a 40° C), tremores e sensibilidade muscular são os primeiros sinais clínicos. Subseqüentemente, ocorrem vômitos, desidratação rápida resultante da parada de ingestão de água, perdas de fluidos aumentadas por lesões dos túbulos renais, aumento da permeabilidade vascular e colapso vascular periférico. Na fase terminal, os animais tornam-se hipotérmicos e depressivos (GREENE & SHOTTS, 1990).

Nos ovinos a forma inaparente é mais comum. Nesse caso os animais estão infectados, mas não apresentam qualquer sinal da doença, dificultando, com isso, o diagnóstico clínico e epidemiológico (RAFYI et al., 1967).

Nessa espécie, embora menos comum, a forma aguda da doença pode ocorrer, caracterizando-se por quadros clínicos de septicemia, hemorragia, nefrite, seguida por

icterícia, hemoglobínúria, mastite sanguinolenta, retorno de cio, abortamento nas ovelhas e anemia hemolítica nos cordeiros com morte na primeira semana de vida (CICERONI et al., 2000).

2.5 Patologia

As lesões macroscópicas nos animais e no homem caracterizam-se pela presença de hemorragias petequiais e, menos comumente, equimóticas, espalhadas pelo corpo. Quando presente a icterícia, a necropsia revela uma intensa coloração amarela ouro, que atinge todo o organismo. Contrasta perfeitamente, a cor amarela espalhada pelo corpo com as inúmeras petéquias existentes (ENRIETTI, 2001).

A hemorragia é muito comum na região inguinal e axilar, não sendo, entretanto, visível perfeitamente nos animais de pele pigmentada. Em síntese, podemos afirmar que as principais modificações patológicas da leptospirose dependem, em última análise, do grau de icterícia, do índice de azotemia e das modificações acarretadas pelo próprio microorganismo que se localiza nos órgãos após a fase septicêmica. Por esse motivo, as lesões estão representadas por hemorragias em quase todos os órgãos, de preferência nas serosas, tubo gastrointestinal, pulmões, adrenais, rins e especialmente, músculos voluntários (ENRIETTI, 2001).

As lesões hemorrágicas são preponderantes nos pulmões, onde se apresentam sob a forma de equimoses, sendo observadas, também, na vesícula biliar, cérebro, músculos e às vezes, em quase todos os órgãos do animal.

O fígado, muitas vezes, mantém-se em volume, porém, em outras ocasiões, encontra-se aumentado e o seu parênquima está corado de amarelo pela bilirrubina. Muitas vezes, a vesícula biliar é encontrada bastante distendida, acumulando bile de cor clara ou mesmo sanguinolenta (RIET-CORREA et al., 2001; ENRIETTI, 2001).

O miocárdio aparentemente normal apresenta focos petequiais e hiperemia dos capilares. As petéquias estão situadas no tecido intersticial do miocárdio, principalmente, do lado endocárdico. Torna-se claro o estado de edema em que se encontram as fibras musculares onde estão presentes elementos provenientes do sangue (ENRIETTI, 2001).

Nos pulmões, as hemorragias são focais e sempre em torno dos vasos que atravessam o parênquima. O órgão apresenta áreas atelectásicas e sofre hepatização, pois é grande a quantidade de elementos do sangue que são encontrados nos alvéolos. As paredes

dão origem a mobilização dos elementos, que pouco a pouco, invadem o parênquima pulmonar e se transformam em grandes macrófagos que contêm hemácias e pigmentos fagocitados (ENRIETTI, 2001; RIET-CORREA, et al., 2001).

O aparelho digestivo também apresenta numerosos pontos de hemorragias no interior da cavidade gastro-entérica. Encontra-se por esse motivo, líquido sanguinolento no estômago e nos intestinos, e a mucosa desses órgãos se apresenta de aspecto hemorrágico puntiforme ou mesmo, com grandes sufusões em toda a sua extensão. Os folículos linfóides do intestino apresentam mobilização dos elementos, pouco evidente com o aumento das placas de Peyer, conseqüente à reação histio-linfocitária que se processa. Microscopicamente, as lesões obedecem às mesmas causas que as lesões macroscópicas (ENRIETTI, 2001).

Nos rins há degeneração hialina e tumefação das células epiteliais dos túbulos, que apresentam vacúolos de diversos tamanhos ou citoplasma de aspecto granular. Cilindros hialinos, e granulares em menor número são observados em muitos túbulos. Ao lado do processo degenerativo, observa-se lesões hemorrágicas que se localizam nos próprios túbulos, como também, na próprias alças glomerulares. No timo observam-se numerosas áreas focais hemorrágicas (RIET-CORREA, 2001).

2.6 Diagnóstico

O diagnóstico da leptospirose deve-se basear nos achados clínicos, sorologia e na detecção e isolamento do agente. Também pode ser empregada a inoculação em animais de laboratório e recentemente, com o advento da biologia molecular, o DNA de *Leptospira* spp. pode ser detectado a partir de vários materiais (FAINE et al., 1999).

2.6.1 Diagnóstico Clínico

Nos ovinos, pode-se suspeitar de leptospirose em rebanhos que apresentam taxas elevadas de abortos e repetições de cio, que são os principais problemas acarretados pela doença nessa espécie. Todavia, quadros clínicos de septicemia, hemorragias, nefrite, seguido de icterícia, hemoglobinúria, mastite sanguinolenta também são sinais sugestivos da doença (CICCERONI et al., 2000).

O diagnóstico pela sintomatologia clínica não é preciso em virtude da similaridade dos sinais clínicos com outras doenças. Portanto, o diagnóstico definitivo deve ser estabelecido por testes indiretos e/ou diretos (MARTINS & CASTIÑEIRAS, 1998).

2.6.2 Diagnóstico Sorológico

A reação de soroaglutinação microscópica (SAM) é o teste recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para o diagnóstico da leptospirose. Os anticorpos formados no animal são dirigidos contra o sorovar específico; entretanto existem reações cruzadas de diferentes sorovares e, assim, o animal pode ser reagente a vários sorovares simultaneamente, dificultando a identificação do sorovar mais prevalente, responsável pela infecção. O estabelecimento do diagnóstico pode ser feito por sorologia pareada, com uma amostra de soro obtida na fase aguda e outra na fase de convalescença. A soroconversão ou uma diferença de quatro diluições entre a primeira e a segunda amostra indica infecção aguda. Por exemplo, título 100 na fase aguda e 800 na fase de convalescença, para o mesmo sorovar. Na prática, por ser difícil a obtenção de amostras pareadas de soro, a sintomatologia e o título de 800 para o sorovar suspeito são altamente sugestivos de leptospirose (HAGIWARA, 2003).

Na bateria de antígenos empregados no teste é incluído pelo menos um representante de cada grupo existente. Quando nem todos os sorogrupos estão presentes, a infecção por sorovares do grupo não representado na bateria de antígenos passa despercebida. Nos Estados Unidos e no Canadá, a maior parte dos laboratórios das universidades inclui apenas os sorovares Bratislava, Canicola, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Hardjo e Hippotyphosa na bateria de antígenos da reação de soroaglutinação microscópica (HAGIWARA, 2003).

Um teste de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) foi desenvolvido para a detecção de anticorpos das classes igG e igM em cães (HARTMAN et al., 1984 a). A igM aumenta com uma semana após a infecção e o título máximo ocorre dentro de 14 dias, com uma subsequente diminuição. Hartman et al., (1984 b) referem que cães morreram na primeira semana da doença apresentando anticorpos igM elevados, enquanto que não foram detectados anticorpos pela soroaglutinação microscópica. Os títulos de igG desenvolvem-se duas semanas após a infecção, atingindo o pico máximo um mês após (HARTMAN et al., 1984 a).

2.6.3 Exame direto em microscopia de campo escuro

Durante a primeira semana de infecção até os dez dias (fase aguda), especialmente entre três e sete dias, as leptospiros podem ser vistas por exame direto em microscopia de campo escuro, utilizando-se sangue, exudato peritonial, pleural ou urina. As vantagens da observação direta são a rapidez na obtenção de espécimes viáveis, o curto período (três a sete dias pós-infecção) em que provavelmente encontra-se um resultado positivo, e a interpretação subjetiva dos resultados, tendo em vista que coleções de fibrina e proteína em preparações a fresco podem ser confundidas com leptospiros (FAINE et al., 1999).

2.6.4 Inoculação em animais de laboratório

Leptospiros virulentos causam infecção em animais de laboratório, que podem ser usados para o isolamento primário a partir de materiais clínicos. O hamster (*Mesocricetus auratus*) é a espécie mais sensível à ação das leptospiros, morrendo em aproximadamente quatro dias após a inoculação (ENRIETTI, 2001), sendo, dessa forma, a espécie de eleição para o isolamento de leptospiros (ALVES et al., 1992; OLIVA et al., 1994). A inoculação por via intraperitoneal é a forma mais eficiente para o estabelecimento e evolução de infecções experimentais pelos variados sorovares de leptospiros nestes animais (SAAP et al., 1980; ANDREANI, 1968; BADIOLA et al., 1983; WOODS et al., 1983; COX & TWIGG, 1981; KRONHAUS et al., 1989; VENUGOPAL & RATNAM, 1990; MACEDO et al., 2004).

2.6.5 Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)

A detecção do DNA de *Leptospiras* spp. pela PCR tem sido de grande utilidade e requer a seleção de *primers* específicos que permitam a amplificação de todas as espécies classificadas como patogênicas ou potencialmente patogênicas, incluindo *L. inadai* e *L. fainei*. As principais vantagens da PCR são: rapidez na obtenção dos resultados, sensibilidade e especificidade elevada, entretanto, a necessidade de equipamentos especiais, o alto custo dos reagentes e a inexistência de procedimentos automatizados e padronizados limitam o seu uso (BATISTA, 2004).

2.7 Tratamento

As leptospirosas são susceptíveis à maioria dos antibióticos, sendo indicados a penicilina, doxiciclina e tetraciclina entre outros. Para a diminuição da replicação das leptospirosas, limitação da leptospiremia e diminuição da eliminação do agente pela urina, são recomendadas duas fases de antibioticoterapia. A penicilina é o antibiótico de eleição para o tratamento da leptospiremia e deve ser administrada no início do curso da doença. Penicilina G procaína na dose de 40,000 a 80,000 UI/kg, intramuscular ou subcutânea, uma ou duas vezes ao dia, durante cinco a sete dias, é o esquema de tratamento mais comumente utilizado (WOHL, 1996).

A diidroestreptomicina é a droga de eleição para a eliminação do agente dos rins e supressão do estado de portador (GREENE & SHOTTS, 1990). Doxiciclina, na dose de 2,5 a 5 mg/kg, uma vez ao dia, durante duas semanas, também é indicada para a eliminação das leptospirosas dos rins (WOHL, 1996).

2.8 Controle e Profilaxia

A prevenção da leptospirose deve se basear em ações que atuem diretamente sobre o animal, como a imunoprofilaxia, pela utilização de vacinas, como aquelas dirigidas para o controle de seus reservatórios, sejam os próprios animais infectados, bem como os roedores e o ambiente (FAINE et al., 1999; HAGIWARA, 2003).

Evidentemente, uma medida de controle importante consiste em evitar a introdução de animais portadores da bactéria no rebanho, entretanto, em função de algumas características epidemiológicas da doença em ovinos essa tarefa torna-se bastante difícil. As medidas gerais, como limpeza do ambiente, são medidas importantes para reduzir as chances de contaminação dos animais (HAGIWARA, 2003).

A vacinação contra a leptospirose é a principal arma para se prevenir a infecção nos animais. As vacinas contendo o microorganismo morto ou inativado são as mais usadas no controle da leptospirose (LANGONI, 1999).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados, para a investigação, 80 ovinos abatidos no Matadouro Público do município de Patos – PB no período de 2005 a 2006. Salienta-se que, em todas as coletas, procurou-se selecionar os animais mais velhos que apresentassem ou não alguma manifestação clínica da doença.

3.2 Amostras

3.2.1 Trato geniturinário

Para a realização da pesquisa foram utilizados os tratos genital e urinário de 80 ovinos incluindo machos e fêmeas. Fragmentos de útero e placenta das fêmeas e as glândulas vesiculares e ampola do ducto deferente dos machos foram utilizados para o isolamento de leptospiros.

3.2.2 Soros Sanguíneos

As amostras de sangue foram colhidas no momento da sangria dos animais utilizando-se tubos de ensaio. Em seguida, foram enviadas ao Laboratório de Doenças Transmissíveis (LDT) do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Patos-PB, onde foi realizado o dessoramento e armazenamento das amostras. Em outro momento, todas as amostras foram testadas pela técnica de soroaglutinação microscópica para o diagnóstico da leptospirose.

A tabela 1 revela o numero de amostras do trato geniturinário e os soros sanguíneos coletados com suas respectivas datas.

Tabela 1. Descrição das coletas segundo a data e o número de amostras para o solamento obtidas a partir do trato geniturinário de ovinos abatidos no matadouro público do município de Patos – PB no período de 2005/2006, Patos – PB, 2007.

| Data das coletas | Amostras | Tratos geniturinário | soros sanguíneos |
|-------------------------|-----------------|-----------------------------|-------------------------|
| 16/09/05 | 1 a 6 | 06 | 06 |
| 30/09/05 | 7 a 13 | 07 | 07 |
| 28/10/05 | 14 a 18 | 05 | 05 |
| 25/11/05 | 19 a 30 | 12 | 12 |
| 16/12/05 | 31 a 35 | 05 | 05 |
| 10/02/06 | 36 a 45 | 10 | 10 |
| 24/02/06 | 46 a 53 | 08 | 08 |
| 28/04/06 | 54 a 64 | 11 | 11 |
| 05/05/06 | 65 a 74 | 10 | 10 |
| 12/05/06 | 75 a 80 | 06 | 06 |

3.3 Meios de Cultura

3.3.1 Meio semi-sólido de Fletcher

Esse meio foi utilizado nas técnicas de isolamento. Para a preparação de 500 ml, pesou-se 1,35g de substrato de Fletcher em um balão volumétrico, ao qual foi adicionado 500 ml de água destilada. Logo em seguida o meio foi autoclavado a 120°C por 30 minutos e enriquecido com 10% de soro normal estéril de coelho, previamente inativado a temperatura de 56 °C em banho-maria por 30 minutos.

Após a adição do soro de coelho, o meio foi submetido a uma nova inativação a 56 °C por 30 minutos. Em seguida, adicionou-se ao meio 2,5 ml do antimicrobiano 5 flúor-uracil. A distribuição do meio foi feita em tubos de ensaio de vidro de 16 X 150 mm com tampa rosqueável, em volume de 5 ml por tubo. Os tubos foram submetidos aos controles de esterilidade e crescimento.

3.3.2 Meio de Ellinhausen, Mccullough, Jhonson e Harris (EMJH)

Esse meio foi utilizado nas técnicas de isolamento e no crescimento dos antígenos empregados na prova de soroglutinação microscópica para o diagnóstico de leptospirose. Pesaram-se, em um balão volumétrico de 1 litro, 1,15g de substrato de EMJH, 0,15g de peptona e 0,1g de extrato de carne e adicionou-se água destilada até a marca de 500 ml e homogeneizou-se com movimentos circulares. Em seguida o meio foi autoclavado a 120 °C por 30 minutos e enriquecido com 10% de soro normal estéril de coelho previamente inativado a 56 °C em banho Maria por 30 minutos.

Foi acrescentado ao meio 1 ml de piruvato de sódio, 1 ml de cloreto de sódio, 1 ml de cloreto de magnésio, 2,5 ml de L-Asparagina como descrito por TURNER (1970) e 2,5 ml do antimicrobiano 5 flúor-uracil. Logo após o meio foi autoclavado a 120 °C por 30 minutos e em seguida distribuído da mesma forma descrita para o meio de Fletcher. Os tubos foram submetidos aos controles de esterilidade e crescimento.

3.4 Diluente

O diluente utilizado para o preparo das suspensões dos órgãos e para a técnica de soroglutinação microscópica foi representado pela solução salina tamponada de Sorensen estéril (SANTA ROSA, 1970).

3.4.1 Preparo da solução salina fisiológica

A solução foi preparada a partir de 8,5 g de NaCl, o qual foi colocado num balão volumétrico, 1 litro de água destilada. Em seguida homogeneizou-se a solução e logo após o balão volumétrico foi embalado com o papel, amarrado e levado para a autoclave a 120 °C por 30 minutos.

3.4.2 Preparo da solução tamponada de Sorensen

A solução foi preparada a partir dos seguintes constituintes: 1,09g de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) e 8,33g de fosfato de sódio (Na_2HPO_4), os quais foram

adicionados a um balão volumétrico, 1 litro de água destilada. Logo após autoclavou-se e deixou-se esfriar e, em seguida, a solução foi colocada num recipiente de vidro âmbar.

3.4.3 Preparo da solução salina tamponada de Sorensen estéril

A solução foi preparada a partir de 1,840 ml de solução salina fisiológica a 0,85% e 160 ml de solução tamponada de Sorensen, as quais foram adicionadas em um balão volumétrico (1 litro), sendo o mesmo autoclavado a 120 °C por 15 minutos e logo após, a solução foi colocada num recipiente de vidro âmbar e acondicionada a 4 °C.

3.5 Isolamento em meio de cultura

O isolamento do agente foi realizado a partir do cultivo em meios sólidos ou semi-sólidos específicos, como o meio de Fletcher e o meio EMJH. As amostras após terem sido submetidas ao processamento no LDT e semeadas nos referidos meios, foram acompanhados semanalmente com leituras micro e macroscópicas na busca de detectar a presença das Leptospiras nos meios. As amostras tidas como suspeitas continham um certo grau de contaminação e com o intuito de purificá-las, foram utilizados Hamsters na técnica de inoculação em animais de Laboratório, estes animais foram brevemente sacrificados e seus soros sanguíneos bem como a urina e o fígado foram processados e semeados novamente no meio de Fletcher em diluições seriadas, onde posteriormente pudemos observar o anel de turvação em todas as amostras e a presença de organismos com morfologia e comportamento semelhantes as Leptospiras. Na figura 2 mostra uma reação característica do crescimento de leptospiras em meio de cultura.

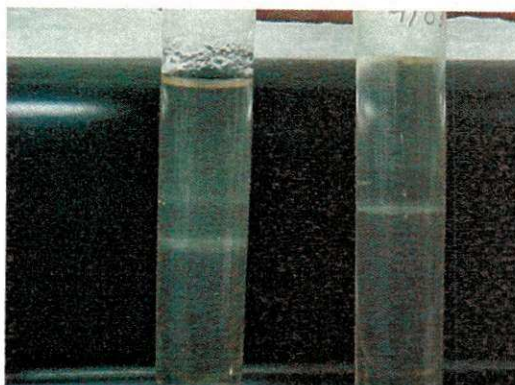


Figura 2. Anel de turvação em meio de cultura Fletcher, indicando o crescimento de *leptospira spp.*
Fonte: BATISTA, 2004.

3.2 Leituras macro e microscópica

3.2.1 Leitura macroscópica

Foram realizadas leituras macroscópicas, através das quais observou-se a presença de contaminantes nos tubos semeados ou formações de anéis de turvação que indicam o crescimento de leptospiras.

3.6.2 Leitura microscópica

Essa leitura foi realizada semanalmente com auxílio de microscópio com condensador de campo escuro.

Primeiramente as amostras a serem acompanhadas foram levadas para a capela estéril. Tomando-se os devidos cuidados assépticos, retirou-se, com o auxílio de uma alça de platina previamente flambada, uma gota de cada amostra, sendo colocadas na lâmina. A seguir a lâmina foi levada para ser examinada, percorrendo-se todo o campo da gota a procura de evidências de leptospiras, utilizando-se as objetivas de, 20X, e 40X.

As amostras só foram desprezadas após completarem 16 semanas sem que houvesse crescimento de leptospiras, ou quando se verificou a presença de contaminantes.

3.7 Técnicas da soroaglutinação microscópica

O diagnóstico sorológico da leptospirose foi realizado pela técnica de soroaglutinação microscópica (GALTON et al., 1965) com uma coleção de antígenos vivos que inclui 17 sorovares de leptospiras vivas (tabela 2). Os sorovares eram utilizados com cinco a oito dias de cultivo no meio de EMJH (TURNER, 1970);

3.7.1 Descrição da técnica

Inicialmente cada amostra de soro foi diluída na razão de 1:50, ou seja, 0,1 ml de soro diluído em 4,9 ml de solução salina tamponada de Sorensen estéril (SANTA ROSA, 1970). Em seguida, alíquotas de 50 µl de cada amostra de soro diluída foram pipetadas para placas de polietileno com 96 poços de fundo chato. Foram então adicionados 50 µl dos antígenos previamente diluídos para cada amostra.

As misturas de soro e antígeno foram incubadas em temperatura ambiente durante uma hora, tempo necessário para que ocorresse a reação antígeno-anticorpo. Ao término do prazo procedeu-se à leitura em microscópio com condensador de campo escuro e objetiva de longa distância.

Amostras que apresentaram menos de 50% de aglutinação no campo de visualização eram consideradas negativas (figura 3).

Ao final do teste de triagem, foi realizada a titulação dos anticorpos dos soros que se apresentaram positivos, foram feitas diluições seriadas numa série geométrica de razão dois a partir da diluição 1:50, em um total de seis diluições. Foi então adicionada, para cada diluição das amostras, 50 µl do antígeno previamente diluído, resultando em diluições de 1:100 até 1:3.200 por amostra.

O título do soro foi obtido até a diluição que apresentou 50% ou mais de aglutinação no campo de visualização (figuras 4). A amostra de soro que apresentasse título 100 era considerada positiva.

O quadro 2 mostra os sorovares de leptospiras empregados como antígenos na técnica de soroaglutinação microscópica aplicada à leptospirose, nessa pesquisa.



Figura 3. Amostra negativa na SAM.

Fonte: FAINE. 1999.



Figura 4. Amostra positiva na SAM.

Fonte: FAINE. 1999.

Caso um animal reagisse para dois ou mais sorovares, esse animal era considerado positivo para o sorovar de maior título.

Quadro 1. Sorovares de *Leptospiras* empregados como antígeno na técnica de soroaglutinação microscópica aplicada à leptospirose em ovinos abatidos no matadouro público do município de Patos – PB no período de 2005/2006, Patos – PB, 2007.

| Sorogrupo | Sorovar | Símbolo |
|---------------------|---------------------|---------|
| Australis | Australis | 1-A |
| Australis | Bratislava | 1-B |
| Autumnalis | Autumnalis | 2-A |
| Autumnalis | Butembo | 2-B |
| Ballum | Castellonis | 3 |
| Bataviae | Bataviae | 4-A |
| Canicola | Canicola | 5 |
| Cynopteri | Cynopteri | 7 |
| Grippotyphosa | Grippotyphosa | 8 |
| Hebdomalis | Hebdomalis | 9 |
| Icterohaemorrhagiae | Copenhageni | 10-A |
| Icterohaemorrhagiae | Icterohaemorrhagiae | 10-B |
| Panamá | Panamá | 12 |
| Pomona | Pomona | 13-A |
| Pyrogenes | Pyrogenes | 14 |
| Serjoe | Hardjo | 15-A |
| Tarassovi | Tarassovi | 17 |

4 RESULTADOS

Em relação ao isolamento de *Leptospira* spp. a partir de fragmentos do trato geniturinário das 80 amostras (animais) testadas pela semeadura em meios de cultura, duas (2,5%) mostraram-se positivas. Para purificação das amostras realizou-se então a técnica de inoculação em animais de laboratório. Um dia após efetuou-se a sangria dos quatro hamsters e a coleta de órgãos como o fígado, também foi feita a punção da bexiga para coleta de urina. Por fim, processaram-se estes materiais que posteriormente foram semeados no meio EMJH utilizando a técnica de diluições seriadas. Em todas as diluições observou-se o aparecimento do anel de turvação característico, como também na microscopia notou-se a presença de estruturas com formato e comportamento destas espiroquetas, chegando-se ao isolamento de duas amostras.

Em relação ao teste de soroaglutinação microscópica realizada em 80 soros, seis (7,5%) animais apresentaram resultado positivo, com 50% de aglutinação no campo de visualização de título igual a 100, indicando a presença de aglutininas anti-leptospiras nos soros estudados.

A tabela 3 descreve as amostras positivas para o isolamento e para o teste de soroaglutinação microscópica aplicada a leptospirose realizado nos soros sanguíneos de ovinos abatidos no Matadouro Público de Patos – PB.

Tabela 2. Amostras positivas para o isolamento e para o teste de soroaglutinação microscópica aplicada a leptospirose de ovinos abatidos no matadouro público do município de Patos – PB no período de 2005/2006, Patos – PB, 2007

| Amostras | Isolamento | Soroaglutinação Microscópica | Sorovares Reagentes | Título de Anticorpos |
|----------|------------|------------------------------|---------------------|----------------------|
| 06 | + | - | - | - |
| 34 | + | - | - | - |
| 23 | - | + | Autumnalis | 1:1600 |
| 28 | - | + | Autumnalis | 1:1600 |
| 29 | - | + | Autumnalis | 1:800 |
| 49 | - | + | Autumnalis | 1:400 |
| 54 | - | + | Autumnalis | 1:100 |
| 67 | - | + | Icterohaemorrhagiae | 1:200 |

(-) Negativo; (+) Positivo

A tabela 4 apresenta a frequência de amostras de soro de ovinos abatidos no Matadouro Público de Patos – PB reagentes pela técnica de soroaglutinação microscópica aplicada a leptospirose segundo o sorovar e seus respectivos títulos.

No presente trabalho, o sorovar mais freqüente foi o Autumnalis, com cinco soros reagentes (83,3%), seguido pelo sorovar Icterohaemorrhagiae com um soro reagente (16,7%).

Tabela 3. Frequência dos soros de ovinos abatidos no Matadouro Público do município de Patos – PB no período de 2005/2006, reagentes pela técnica de soroaglutinação microscópica aplicada a leptospirose segundo o sorovar e seus respectivos títulos, Patos – PB, 2007.

| Sorovares | Títulos | | | | | Total (%) |
|---------------------|---------|---------|---------|---------|---------|-----------|
| | 100 | 200 | 400 | 800 | 1600 | |
| Autumnalis | 1 | 0 | 1 | 1 | 2 | (83,3%) |
| Icterohaemorrhagiae | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | (16,7%) |
| Total | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 6 |
| (%) | (16,7%) | (16,7%) | (16,7%) | (16,7%) | (33,3%) | (100%) |

5 DISCUSSÃO

O isolamento de *Leptospiras* a partir do trato geniturinário de ovinos foi positivo para 02 (2,5%) dos animais pesquisados, indicando a presença da bactéria em um macho tendo como sítio de localização a ampola do ducto deferente e em uma fêmea localizando-se neste caso na placenta. Esses resultados equiparam-se aos de ARAUJO et al. (2005) que, em estudo bacteriológico, identificou leptospiras presentes no útero e ovários de ovelhas também abatidas no Matadouro público de Patos – PB.

Achados de ELLIS et al., (1986), também ressaltaram a importância do trato genital como sítio de localização de leptospiras, uma vez que, em sua pesquisa, a bactéria foi isolada a partir do útero de porcas advindas de propriedades onde a leptospirose estava instalada. O isolamento de leptospiras viáveis a partir de animais recém abatidos reforça ainda mais a importância da leptospirose em saúde pública. O matadouro público de Patos – PB segue uma linha onde tecnologias que visem um abate seguro e higiênico inexistem, onde os magaferes, normalmente pertencentes a classes sociais menos favorecidas, executam seu trabalho sem condições mínimas de assepsia e segurança. Segundo ALMEIDA et al. (1994), médicos veterinários, magarefes, agricultores, fazendeiros e tratadores de animais são considerados grupos com maior risco de contrair a infecção, principalmente se essas atividades são executadas na ausência de recursos tecnológicos e equipamentos de segurança.

Em relação ao teste de soroaglutinação microscópica, seis (7,5%), entre os 80 animais estudados, apresentaram reação positiva. Resultados inferiores foram encontrados por ZAMORA et al. (1999), que encontraram 5,7% de prevalência para a leptospirose pesquisando ovelhas no Chile. Resultados superiores também foram encontrados por HERRMANN et al. (2004), que, trabalhando com ovinos na região sul do Brasil, encontraram 34,26% de positividade para o teste de soroaglutinação microscópica.

Essas variações entre os resultados encontrados nos vários estudos realizados em ovinos, pode estar associadas a fatores relacionados a epidemiologia da doença, que podem afetar o seu comportamento, com destaque para a topografia, região, temperatura, pluviosidade, reservatórios silvestres e domésticos e outros fatores ambientais (ALVES et al., 2000).

Segundo ALVES (1995) as condições do ambiente influenciam bastante no comportamento da Leptospirose nos ovinos, podendo-se relacionar altos índices pluviométricos com taxas maiores de ocorrência da enfermidade.

No presente estudo o sorovar mais freqüente foi o Autumnalis, responsável por (83,3%) das reações positivas. Dados semelhantes foram encontrados por ARAÚJO, (2005); VIEGAS et al. (1990) entre outros.

Alguns autores encontraram resultados diferentes dos encontrados nessa pesquisa para os sorovares de *Leptospira* spp. mais freqüentes em ovinos. FAVERO et al. (2002), encontraram o sorovar Icterohaemorrhagiae como mais prevalente, em uma pesquisa feita em vários estados, discordando da presente pesquisa em que o sorovar citado obteve uma prevalência de (16,7%) sendo neste caso o menos prevalente. ALVES (1995), trabalhando no Cariri Paraibano, encontrou resultado semelhante, sendo o sorovar Icterohaemorrhagiae responsável por 16,87% das reações positivas.

Os dois animais positivos para o isolamento de leptospiras, mostraram-se sorologicamente negativos. Embora controverso, a ocorrência desse fato não é única, em pesquisas sobre isolamento e sorologia. YASUDA & SANTA ROSA (1981), trabalhando com isolamento em cães, isolaram a bactéria em 35 animais a partir do rim, sendo que dentre eles 5 (14,3%) apresentavam sorologia negativa para leptospirose. Isso pode ocorrer pelo fato das leptospiras serem antígenos pobres ARDUINO et al. (2004), induzindo respostas imunológicas baixas e por curto período de tempo. Desta forma o animal pode estar infectado porém não apresentar um título de anticorpos suficientes para caracterizar uma reação de soroaglutinação positiva.

Encontrar animais positivos para a sorologia que são negativos para o isolamento é bem mais comum. Nestes casos, uma série de fatos estão envolvidos. Os títulos sorológicos encontrados podem ser de contato com o agente sem a evolução da infecção. Em infecção recente, o animal pode apresentar altos títulos sorológicos sem, no entanto, ter ocorrido a colonização do trato geniturinário. Em certos casos, o número de leptospiras presentes no órgão pode ser insuficiente para o sucesso no isolamento (SHIMABUKURO et al., 2003).

6 CONCLUSÕES

Verificaram-se duas amostras positivas para o isolamento de *Leptospira* spp. a partir de tecidos do trato geniturinário de dois (2,5%) ovinos clinicamente sadios.

A sorologia revelou seis (7,5%) soro-reagentes com reações para os sorovares Autumnalis e Icterohaemorrhagiae.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUSSLAM, M. Situacion mundial del problema de la leptospirose IN: **REUNION INTERAMERICANA SOBRE EL CONTROL DE LA FIEBRE AFTOSA E OTRAS ZOONOSIS**, Guatemala, 1975. P. 142-153.

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales**. 3. ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 2003. v.2. 425p.

ALMEIDA, L.P.; MARTINS, L.F.S.; BROD, C.S. Levantamento soroepidemiológico de leptospirose em trabalhadores do serviço de saneamento ambiental em localidade urbana da região sul do Brasil. **Rev. Saúde Pública**, v.28, n.1, p.76-81.,1994.

ALVES, C.J.; VASCONCELLOS, S.A.; CAMARGO, C.R.A.; MACEDO, N.A.; MORAIS, Z.M.; NÜRMBERGER JÚNIOR, R.; PINHEIRO, S.R.; FERREIRA NETO, J.S. Influência da estimulação inespecífica com o BCG sobre a susceptibilidade do hamster à infecção experimental por *Leptospira interrogans* sorotipo *pomona*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.29, n.2, p.193-199, 1992.

ALVES, C.J. **Influência de fatores ambientais sobre a proporção de caprinos sororeatores para a leptospirose em cinco centros de criação do estado da Paraíba, Brasil**. São Paulo, SP, 1995. 104p. Tese (Doutorado) – Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 1995.

ALVES, C.J.; ANDRADE, J.S.L.; VASCONCELLOS, S.A.; MORAIS, Z.M.; AZEVEDO, S.S.; SANTOS, F.A. Avaliação dos níveis de aglutininas anti-leptospira em cães no município de Patos-PB, Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.7, n.2, p.17-21, 2000.

ANDREANI, E. Leptosirosi da sierotipo *hardjo*. Prove di infezione sperimentale in animale di laboratorio. **Zooprofilassi**, v.23, p.557-569, 1968.

ANDREANI, E.; SANTARELLI E.; DILIGENTI R. Leptospirosi degli ovini, infezione naturale da sierotipo *hardjo*. **Annali Della Facoltà Di Medicina Veterinaria. Università Di Pisa**, v.27, p.33-40, 1974.

ARAUJO NETO, J.O. **Isolamento de Leptospira spp. A partir do trato genital de ovelhas abatidas no Matouro Público de Patos-PB, Estado de Paraíba, Brasil.** 2005. 58f. Monografia (para obtenção do grau de Médico Veterinário) – Universidade Federal de Campina Grande, Patos-PB.

ARDUINO, G.G.C.; GIRIO, R.J.S., FREIRE, M.M. Anticorpos contra *Leptospira* spp. Em bovinos leiteiros vacinados com bacterina polivalente comercial: perfil sorológico frente a dois esquemas de vacinação. **Cienc. Rural**, v. 34, n.3, p.865-871, 2004.

BADIOLA, J.; THIERMANN, A.B.; CHEVILLE, N.F. Pathology features of leptospirosis in hamsters caused by *L. interrogans* serovars *hardjo* and *szwajizak*. **American Journal of Veterinary Research**, v.44, p.91-99, 1983.

BATISTA, C.S. A. **Soroprevalência e fatores de risco para a leptospirose em cães da cidade de Campina Grande, Estado da Paraíba, Brasil.** 2004. 49f. Monografia (para obtenção do grau de Médico Veterinário) – Universidade Federal de Campina Grande, Patos-PB.

BEAMER, P.D.H.; DARDENBROOK, J.; MORRIL, C.C. Studies on leptospirosis in domestic animals. I. Leptospirosis in sheep. **Vet. Med**, v.48, p.365-366, 1953.

BEER, J. **Doenças infecciosas em animais domésticos.** 2. ed. São Paulo: Roca, 1999. 380p.

BLENDEN, D.C. Aspectos epidemiológicos de la leptospirosis. IN: **REUNION INTERAMERICANA SOBRE EL CONTROL DE LA FIEBRE AFTOSA Y OTRAS ZOONOSIS**, Guatemala, 1976. p.160-168.

CACCHIONE, R.A.; CEDRO, V. C. F.; BULGINI, M.J.D.; CASCELI, S.; MARTINEZ, E. S. Leptospirose ovina. **Investigación sobre su frecuencia en la Argentina. Aislamiento y clasificación de una cepa ovina.** Buenos Aires, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Instituto de Zoonosis (Serie Técnica, 24), 1963.

CICERONI, L., LOMBARDO, D., PINTO, A., CIARROCCHI, S. & SIMEONI, J. Prevalence of antibodies to *Leptospira* serovars in sheep and goats in Alto Adige-South Tyrol. **Journal Veterinary Medicine**, v.47, n.5, p.217-223, 2000.

CORREA, M.O.A.; VERONESI, R.; BRITO, T.; HYAKUTAKE, S.; SANTA ROSA, C.A.; EDELWEISS, E.L. Leptospiroses. In: VERONESI, R. (Ed.) **Doenças infecciosas e parasitárias**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. p.573-589.

CÔRTEZ, J.A. Aspectos epidemiológicos e ecológicos da leptospirose. IN: **ANAIS DO III ENCONTRO NACIONAL EM LEPTOSPIROSE**. Rio de Janeiro, 1993. p.53-57.

COX, P.J.; TWIGG, G.I. Observations on kidney damage in hamsters following a non-icterohaemorrhagic form of disease resulting from infection by *Leptospira interrogans* serotype icterohaemorrhagiae. **Journal of Comparative Pathology**, v.91, p.153-157, 1981.

DAVIDSON, K.R. *Leptospira hardjo* infection in man associated with a outbreak in a dairy herd. **Australian Veterinary journal**, v.47, p.408, 1971.

ELLIS, W. A.; MCPARLAND, P. J.; BRYSON, D. G.; MALONE F.E. Possible involvement of leptospiroses in abortion, stillbirths and neonatal deaths in sheep. **Vet. Rec.**, v.112. p.291-293, 1983.

ELLIS, W.A.; MCPARLAND, P.J.; BRYSON, D.G.; THIERMANN, A.B.; MONTGOMERY, J. Isolation of leptospiroses from the genital tract and kidneys of aborted sows, **Vet. Rec.** v.118, n.11, p.294-295, 1986.

ENRIETTI, M.A. Contribuição ao Conhecimento da Incidência de Leptospiras em Murídeos, Caninos e Suínos no Paraná. **Braz. arch. biol. Technol**, vol.jubilee, p.311-342, 2001.

FAVERO, A.C.M.; PINHEIRO, S.R.; VASCONCELLOS, S. A. Sorovares de leptospiras predominantes em exames sorológicos de bubalinos, ovinos, caprinos, eqüinos, suínos e cães de diversos estados brasileiros. **Cienc. Rural**, v.32, no.4, p.613-619, 2002.

FAINE, S. **Guidelines for the control of leptospirosis**. World health organization. 1982. 171p.

FAINE, S., ADLER, B., BOLIN, C.; PEROLAT, P. **Leptospira and Leptospirosis**. 3. ed. Melbourne: MediSei, 1999. 272p.

FREITAS, J.C.; SILVA, F.; OLIVEIRA, R.C.; Isolamento de *Leptospira* spp. de cães, bovinos e suínos naturalmente infectados. **Cienc. Rural**, vol.34, no.3, p.853-856, 2004.

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

GIRIO, R.J.S.; PEREIRA, F.L.G.; MARCHIORI FILHO, M. Pesquisa de anticorpos contra *Leptospira* spp. em animais silvestres e em estado feral da região de Nhecolândia, Mato Grosso do Sul, Brasil: utilização da técnica de imuno-histoquímica para detecção do agente. **Cienc. Rural**, vol.34, no.1, p.165-169, 2004.

GREENE, C.E.; SHOTTS, E.B. Leptospirosis. In: GREENE, C.E. (Ed.) **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1990. p.498-507.

GUIMARÃES, M.C. Epidemiologia e controle da leptospirose em bovinos. Papel do portador e o seu controle terapêutico. **Rev Fac Med Vet Zootec USP**, v.19, n.2, p.202, 1982.

HAGIWARA, M.K. **Leptospirose canina**. São Paulo: Pfizer Saúde Animal (Boletim Técnico). 2003. 6p.

HARTMAN, E.G.; VAN HOUTEN, M.; VAN DER DONK, J.A. Determination of specific anti-leptospiral immunoglobulins M and G in sera of experimentally infected dogs by solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.7, p.43-51, 1984a.

HARTMAN, E.G.; VAN HOUTEN, M.; VAN DER DONK, J.A. Serodiagnosis of canine leptospirosis by solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.7, p.33-42, 1984b.

HERRMANN, G.P.; LAGE, A.P.; MOREIRA, E.C. Soroprevalência de aglutininas anti-*Leptospira* spp. em ovinos nas Mesorregiões Sudeste e Sudoeste do Estado Rio Grande do Sul, Brasil. **Cienc. Rural**, vol.34, no.2, p.443-448, 2004.

KRONHAUS, A.E.; BARRIOLA, J.E.; SARAVÍ, M.A. Aislamiento y detección de *Leptospira interrogans* a partir de la medula ósea femoral de hamsters inoculados experimentalmente. **Revista de Medicina Veterinaria**, v.70, p.82-88, 1989.

LANGONI, L. Leptospirose: aspectos de saúde animal e de saúde pública. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, v. 2, n. 1, p. 52-58, 1999.

LEON-VIZCAINO, L.; MENDONZA M. H.; GARRIDO F. Incidente of abortions caused by leptospirosis in sheep and goats in Spain. **Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.**, v.10, p.149-153, 1987.

LINS Z. C., LOPES M. L., Isolation of *Leptospira* from wild forest animals in Amazonian Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 78:124-126, 1984.

MACEDO, N.A.; MORAIS, Z.M.; CAMARGO, C.R.A.; ALVES, C.J.; AZEVEDO, S.S.; NÜRMBERGER JÚNIOR, R.; VASCONCELLOS, S.A. Influência da via de inoculação

sobre o estabelecimento e evolução da leptospirose em hamsters (*Mesocricetus auratus*) experimentalmente infectados com *Leptospira interrogans* sorovar Pomona. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.41, n.2, 2004.

MANUAL DE CONTROLE DA LEPTOSPIROSE. **Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde-Leptospirose**. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos. 2 ed. rev. Brasília : Fundação Nacional de Saúde, 1989. 98p.

MARTINS, F.S.V.; CASTIÑEIRAS, T.M.P.P. III. Leptospirose. In: SCHECHETER, M.; MARANGONI, D.V. (Eds.). **Doenças infecciosas: conduta diagnóstica e terapêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p.145-152.

MASCOLLI, R. **Inquérito sorológico para leptospirose, doença de Lyme e leishmaniose em cães do município de Santana de Parnaíba, São Paulo. Colheitas efetuadas durante a campanha de vacinação anti-rábica, no ano de 1999**. 2001. 140f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo.

OKAZAKI, W. & RINGER, L.M. Some effects of various environmental conditions on the survival of *Leptospira pomona*. **American Journal of Veterinary Research**, v.1, p. 219-223, 1957.

OLIVA, R.; INFANTE, J.F.; GONZALEZ, M.; PEREZ, V.; SIFONTES, S.; MARRERO, O.; VALDES, Y.; FARIÑAS, M.; ESTEVEZ, L.; GONZALEZ, I. Pathologic-clinical characterization of Leptospirosis in a Golden Syrian Hamster Model. **Archives of Medical Research**, v.25, n.2, p.165-170, 1994.

QUINN, P.J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. **Clinical veterinary microbiology**. Virginia : Wolfe, 1994. 648p.

RAFYI, A.; MAGHAMI, G.; NIAK, A.L. Leptospirosis in ovine and caprine. **Bull. Off Inst. Epizoot.**, v.68, p.43-59, 1967.

RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MÉNDEZ, M.C.; LEMOS, R.A.A. **Doenças de ruminantes e eqüinos**. 2.ed. São Paulo: Varela, 2001. 426p.

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

SAPP, W.J.; SIDIQUE, I.H.; WILLIAMS, S.S.; GRAHAN, T. Histopathological evaluation of livers of pregnant hamsters infected with *Leptospira canicola*. **American Journal of Veterinary Research**, v.41, p.1283-1292, 1980.

SHIMABUKURO, F.H.; DOMINGUES, P.F.; LANGONI, H. Pesquisa de suínos portadores renais de leptospiras pelo isolamento microbiano e reação em cadeia pela polimerase em amostras de rins de animais sorologicamente positivos e negativos para leptospirose. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, vol.40, n.4, p.243-253, 2003.

SILVA, M.V.D. & SILVA, E.D.F. Possíveis causas de aborto em caprinos. **Comunicado técnico. EMBRAPA – Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos**, v.12, p.1-9, 1983.

SMITH R., HENCH E. AND REYNOLDS I. Experimental leptospirosis in pregnant ewes. VI. **Immunofluorescence in the diagnosis of fetal leptospirosis**. *Cornell Vet.* 56, 646-647 1986.

SMITH, B.P. **Tratado de medicina interna de grandes animais: moléstias de eqüinos, bovinos, ovinos e caprinos**. Vol. 2. São Paulo: Manole, 1994.

SZYFRES, B. La leptospirosis como problema de salud humana y animal en América latina y el area del Caribe. IN: **REUNION INTERAMERICANA SOBRE EL CONTROL DE LA FIEBRE AFTOSA Y OTRAS ZOONOSIS**, Guatemala, 1975. p.125-141.

TORTEN, M. Leptospirosis. IN: STELLE, J. H.; STOENNER, H.; KAPLAN, W. **CRC handbook series in zoonosis. seccion A: Bacterial, rickettsial and micote diseases**. Boca Raton: CRC Press, 1979, p.363-421.

TURNER, L.H. Leptospirosis III. Maintenance, isolation and demonstration of leptospiras. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. V.64, p.623-646, 1970.

VASCONCELLOS, S.A. O papel dos reservatórios na manutenção de leptospirose na natureza. **Comunicações Científicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, V.11, p.17-24, 1987.

VASCONCELLOS, S.A. Leptospirose animal. IN: **III ENCONTRO NACIONAL EM LEPTOSPIROSE**, Rio de Janeiro, 1993. p.62-65.

VENUGOPAL, K.; RATNAM, S. Lesions and immune responses produced in hamsters and guinea pigs inoculated with some strains of leptospira. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.28, p.1075-1077, 1980.

VIEGAS, E.A., VIEGAS, S.A.R.A., CALDAS, E.M. Aglutininas anti-leptospira em hamsters and guinea pigs inoculated with some strains of leptospira. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.28, p.1075-1077, 1990.

WOHL, J.S. Canine leptospirosis. **Compendium of Continuing Education Practicing Veterinarian**, v.18, n.11, p.1215-1224, 1996.

WOODS, S.R.; MALLEY, A.D.; FRERICHS, J.B. Isolation of a hamster lethal strain of *Leptospira interrogans* serotype hardjo. **Veterinary Record**, v.112, p.437-438, 1983.

YASUDA, P.H.; SANTA ROSA, C.A. Correlação entre soroglutinação e solamento de leptospiras em cães. **Rev. Microbiol**, v.12, n.2, p.35-37, 1981.

ZAMORA J; RIEDEMANN S; TADICH N.A. A serological survey of leptospirosis in sheep in Chile. **Rev Latinoam Microbiol**. V.41, n.2, p.73-76, 1999.