



Universidade Federal do Pará
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Amazônia Oriental
Universidade Federal Rural da Amazônia
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Mário Arthur da Costa Leal

Determinação da ocorrência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em búfalos (*Bubalus bubalis*) criados no Bioma Amazônico Paraense

Belém
2015

Mário Arthur da Costa Leal

Determinação da ocorrência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em búfalos (*Bubalus bubalis*) criados no Bioma Amazônico Paraense

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Instituto de Medicina Veterinária. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia. Área de concentração: Produção Animal. Orientador Prof. Dr. Felipe Masiero Salvarani

**Belém
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) –
Sistema de Bibliotecas da UFPA

Leal, Mário Arthur da Costa

Determinação da ocorrência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em búfalos (*Bubalus bubalis*) criados no Bioma Amazônico Paraense / Mário Arthur da Costa Leal - 2015.

Orientador: Felipe Masiero Salvarani
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Belém, 2015.

1. Búfalo – Doenças - Pará. 2. Leptospirose em animais – Diagnóstico - Pará.
3. Medicina veterinária. I. Título.

CDD 22. ed. 636.0896959

★ **Mário Arthur da Costa Leal**

Determinação da ocorrência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em búfalos (*Bubalus bubalis*) criados no Bioma Amazônico Paraense

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Instituto de Medicina Veterinária. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia. Área de concentração: Produção Animal.

Data da aprovação. Belém - PA: 04 / 12 / 15

Banca Examinadora

F. Masiero

Prof. Dr. Felipe Masiero Salvarani – UFPA

Rômulo Cerqueira Leite

Prof. Dr. Rômulo Cerqueira Leite – UFPA

Hilma Lúcia T. Dias

Prof. Dra. Hilma Lúcia Tavares Dias – UFPA

À minha família
com todo carinho

AGRADECIMENTOS

À Deus.

À Universidade Federal do Pará em especial o Programa de Pós-graduação em Ciência Animal – PPGCAN.

Ao professor Felipe Masiero Salvarani pela orientação, conhecimento transmitido, críticas e todo apoio necessário para comigo na construção deste trabalho.

Ao professor Rômulo Cerqueira Leite por ter confiado no meu trabalho e pelo empenho concedido para o desenvolvimento deste trabalho.

À professora Hilma Lúcia Tavares Dias, pela amizade e generosidade por abrir espaço em seu laboratório para que eu pudesse desenvolver atividades relacionadas a este trabalho, ao curso de mestrado, a pesquisa e pelo aprendizado.

Ao professor Marcos Xavier Silva, por possibilitar a realização das atividades relacionadas a este trabalho no laboratório de Leptospirose do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UFMG.

Ao Hospital de Medicina Veterinária, Setor de Grandes Animais, Instituto de Medicina Veterinária da UFPA, em especial Tatiane Teles Albernaz, pelas amostras estudadas neste trabalho.

Aos colegas André Almeida Fernandes e Graciela Kunrhat Lima do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UFMG, pelo apoio dado durante a análise das amostras.

À Cássia Maria Pedroso dos Santos e Joselisa das Chagas Maia pelo apoio dado no laboratório.

Ao amigo Wilton Rabelo Pessoa pelos conselhos e apoio dado durante o mestrado.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

RESUMO

O presente trabalho objetivou estudar a ocorrência da infecção por *Leptospira* spp. em bubalinos no Bioma Amazônico do Estado do Pará, assim como, identificar os sorovares de maior ocorrência na região. Foram testadas 387 amostras de soro bubalino de nove municípios paraenses, Cachoeira do Arari, Santa Cruz do Arari, Salvaterra, Soure e Chaves, localizados na Ilha de Marajó, Abaetetuba, IPIXUNA, Nova Timboteua e Paragominas, localizados na região continental. Foram testados oito sorovares: Bataviae, Bratislava, Hardjobovis, Hardjo (OMS), Hardjo (CTG), Icterohaemorrhagiae, Pomona e Hardjo (Bolivia), por meio da técnica de soroaglutinação microscópica (SAM). Do total de amostras testadas 354 (91,50%) foram sororeagentes para pelo menos um sorovar testado e 33 (8,50%) tiveram resultado negativo. Três dos sorovares do sorogrupo Sejroe tiveram maior ocorrência, sendo Hardjo (Bolivia) (79,30%), Hardjo (OMS) (64,8%), Hardjobovis (64,10%). É importante conhecer os sorovares de maior ocorrência na região estudada para que os direcionamentos de combate e controle da infecção sejam eficientes, minimizando o potencial risco de contaminação e manutenção da leptospirose no rebanho.

Palavras-chave: Leptospirose. Diagnóstico. Bubalinocultura. Pará.

ABSTRACT

This study investigated the occurrence of *Leptospira* spp. in buffaloes in the Amazon biome of Pará, as well as identify the higher incidence of serotypes in the region. They tested 387 serum samples of buffalo nine Pará municipalities, Cachoeira do Arari, Santa Cruz do Arari, Salvaterra, Soure and Chaves located on Marajó Island, Abaetetuba, Ipixuna, Nova Timboteua and Paragominas, located on the mainland. Eight serotypes were tested: Bataviae, Bratislava, Hardjobovis, Hardjo (OMS), Hardjo (CTG), Icterohaemorrhagiae, Pomona and Hardjo (Bolivia), through the microscopic agglutination test method (SAM). Of the total samples tested 354 (91.50%) were reactive serum for at least one serovar and 33 (8.50%) were negative. Three serotypes of serogroup Sejroe were more frequent, Hardjo (Bolivia) (79.30%), Hardjo (OMS) (64.8%) and Hardjobovis (64.10%). It is important to know the higher incidence of serotypes in the region studied so that the directions of combat and infection control are efficient, minimizing the potential risk of contamination and maintenance of leptospirosis in the herd.

Keywords: Leptospirosis. Diagnosis. Buffalo. Pará.

LISTA DE SIGLAS

DNA	Ácido Deoxirribonucleico
ELISA	Teste imunoenzimático
EMJH	Ellinghausen, McCollough, Johnson e Harris
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
µl	Microlitros
µm	Micrometros
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
SAM	Soroaglutinação Microscópica
SST	Solução Salina Tamponada
UFPA	Universidade Federal do Pará
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PV	Peso Vivo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 HISTÓRICO	12
2.2 AGENTE ETIOLÓGICO	13
2.3 EPIDEMIOLOGIA.....	15
2.4 PATOGENIA.....	19
2.5 SINAIS CLÍNICOS	20
2.6 DIAGNÓSTICO	21
2.7 PROFILAXIA E CONTROLE.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 ESPÉCIMES CLÍNICOS	25
3.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS.....	26
3.2.1 Teste de Soroaglutinação Microscópica (SAM)	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5. CONCLUSÃO.....	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

1. INTRODUÇÃO

A criação de búfalos vem se destacando dentre as diferentes produções pecuárias por várias regiões do mundo, devido ao potencial produtivo da espécie, que resulta em produtos com características específicas, de boa qualidade e com alto valor agregado. A carne do búfalo com baixo teor de gordura, maior teor proteico, e seu leite com maior rentabilidade industrial, além do couro e o uso para o trabalho e tração, tem feito da bubalinocultura um segmento econômico alternativo importante e atrativo. No Brasil, os búfalos foram introduzidos no final do século XIX, originários da Ásia, Europa e Caribe. Atualmente são criados em franca expansão em diferentes regiões do país, por apresentar alta rusticidade e adaptabilidade a diferentes climas e relevos, características que favorecem sua produção, representando uma opção econômica tanto para pequenos produtores quanto para produções mais tecnificadas brasileiras.

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o estado do Pará se destaca por possuir o maior quantitativo bubalino brasileiro com cerca de 510 mil cabeças que estão distribuídas no baixo, médio amazonas e, principalmente, na Ilha de Marajó, onde se encontra a maior concentração, com 378 mil animais, sendo a bubalinocultura o principal setor econômico da Ilha. O bioma amazônico reúne características favoráveis para a criação de bubalinos, onde estes animais são produzidos predominantemente de forma ultra extensiva, caracterizado por um deficiente controle nutricional e sanitário, tornando-os favoráveis a instalação de doenças infecciosas e carenciais, sendo, por isso, importante o controle, a investigação e o monitoramento de doenças nestes animais para que não diminua seu potencial produtivo e conseqüentemente o lucro do criador.

A leptospirose, uma das principais doenças infecciosas que podem acometer os búfalos, pode afetar desde a taxa de reposição do rebanho por causar aborto, até a qualidade e quantidade da produção de leite em decorrência de quadros clínicos de mamite, tornando-a uma doença importante pelos possíveis impactos negativos na cadeia produtiva bubalina. Além do efeito direto sobre a pecuária, a leptospirose, uma antropozoonose, que ocorre em regiões tropicais, onde o clima favorece o desenvolvimento desta doença, pode ser considerado também um problema de saúde pública, com a possível participação do búfalo como elo importante na manutenção do ciclo da leptospirose para o ser humano.

Diante da importância da bubalinocultura como um alternativo e emergente segmento pecuário no Brasil, em especial para estado do Pará, associado ao negligenciamento do

controle, investigação e monitoramento das doenças infecciosas nestes animais, o presente estudo teve como objetivo determinar a ocorrência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em soros sanguíneos de búfalos criados no bioma amazônico paraense.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

O búfalo foi introduzido no Brasil no final do século XIX originário de regiões do Caribe, Ásia e Europa. O primeiro lote de bubalinos chegou ao Brasil, vindo da Itália em 1895, sendo introduzido inicialmente na Ilha de Marajó, pelo criador Vicente Chermont de Miranda (LIRA et al., 2005). A espécie bubalina é caracterizada por sua docilidade e potencial produtivo para carne, couro e leite, além de ser utilizado para o trabalho, gerando um impacto positivo relevante na economia regional. No Brasil são encontradas quatro raças bubalinas, Murrah, Jafarabadi e Mediterrâneo que são utilizadas para produção de leite e carne, e a raça Carabao utilizada tanto para produção de carne, como para o trabalho de tração, devido a sua estrutura muscular bem desenvolvida (LIRA et al., 2005; KONRAD et al., 2013).

Com intuito de substituir criações de bovinos não adaptados e que não apresentavam bom desempenho produtivo em algumas regiões do país, o búfalo foi introduzido e apresentou crescimento e rentabilidade produtiva no que diz respeito à produção de leite e derivados, atividade ainda em franco crescimento, com a fabricação de iogurtes, queijos e leites fermentados a partir do leite de búfalas. Seus melhores valores nutricionais, principalmente maiores índices de gordura e proteínas em relação ao leite de vaca, tem chamado a atenção da indústria de laticínio que ainda pouco explora o leite de búfala como matéria prima, como uma fonte alternativa ao leite de vaca e com maiores potenciais em questão de rentabilidade e agregação de valor ao produto final (VERRUMA; SALGADO, 1994; SOUSA et al., 2002; CUNHA NETO et al., 2005; BERNARDES, 2007).

A característica da carne bubalina também apresenta particularidades importantes, como fonte de proteína alternativa, com teores de proteínas elevados e baixo teor de lipídio e colesterol, quando comparados à carne de outras espécies, principalmente a carne bovina. O rendimento de cortes primários também agrega valor para a carne de búfalos, que nos últimos anos tem tido aumento do consumo e escoamento para o mercado nacional, colocando-a em um lugar de destaque na pecuária nacional, contribuindo no incremento do produto interno bruto do país (JORGE, 2005; LIRA et al., 2005; BERNARDES, 2007).

O estado do Pará se destaca nacionalmente na produção de búfalos por possuir o maior quantitativo do rebanho brasileiro com aproximadamente 500 mil cabeças, sendo que a Ilha de Marajó se destaca como a região que detém o maior efetivo bubalino dentro do estado com 378 mil animais (IBGE, 2013), no entanto apresenta diversos entraves e limitações em relação à produção racional e rentabilidade de búfalos. Dentre os fatores limitantes podemos destacar a ampla extensão territorial e a criação extensiva adotada pela maioria dos produtores; a dificuldade de acesso à maioria das propriedades rurais, o que dificulta o escoamento da produção; a falta de infraestrutura nas propriedades rurais, que não disponibilizam cercas dificultando o controle da produção e implantação de técnicas agroprodutivas, onde os animais se alimentam de pastagens nativas pobres em nutrientes e minerais; a falta de energia elétrica, importante para a conservação do leite e derivados; e, principalmente, a inexistência de um controle higiênico-sanitário e suplementação mineral do rebanho (BARBOSA, 2005).

O controle sanitário do rebanho é uma característica essencial para um bom desempenho produtivo, uma vez que a ocorrência de doenças infecciosas afeta diretamente a produtividade e a rentabilidade do sistema de criação. Para o desenvolvimento econômico da bubalinocultura e conseqüentemente melhoria de vida do produtor, é necessário o aumento populacional do rebanho, este diretamente ligado ao bom funcionamento do sistema reprodutivo dos animais. Porém, uma das doenças que pode alterar o bom funcionamento reprodutivo e produtivo dos animais é a leptospirose, por determinar redução da fertilidade do rebanho, causando aborto, nascimento de bezerros fracos, acarretando em menor número de terneiros disponíveis para comercialização,aios irregulares, maior intervalo entre partos, além da diminuição temporária na produção de leite (VIANA et al., 2009; GIRALDO et al., 2014; CARVALHO et al., 2015).

2.2 AGENTE ETIOLÓGICO

O agente etiológico da leptospirose é uma bactéria espiroqueta com cerca de 0,1µm de diâmetro e 6-20µm de comprimento, seu formato é cilíndrico e helicoidal com a presença de um axóstilo que contrai e possibilita a movimentação facilitando a infecção e suas extremidades são em forma de gancho (LEVETT, 2001; BHARTI et al., 2003).

O microrganismo pode permanecer viável em água limpa por até 152 dias (GENOVEZ, 2009) e solos úmidos durante 183 dias (BRODE; FEHLBERG, 1992), mas não tolera alta salinidade, dessecação, pH ácido e a competição bacteriana em meios muito contaminados. São bactérias aeróbias obrigatórias, com crescimento ótimo em torno de 28-

30°C, sendo que para visualização é necessário a utilização da microscopia de campo escuro e para visualização com técnicas de coloração devem ser utilizadas técnicas de impregnação pela prata ou de imunofluorescência, já que a bactéria não se cora de forma satisfatória pelas técnicas de coloração de Gram (LEVETT, 2001; BHARTI et al., 2003; GENOVEZ, 2009; ADLER; MOCTEZUMA, 2010).

O crescimento da bactéria muitas vezes é lento no primeiro isolamento, podendo chegar até 13 semanas, e crescem melhor em meios de cultura líquidos ou semi-sólidos, contendo meios de enriquecimento como albumina bovina ou soro de coelho. Atualmente o meio de cultura mais utilizado é o Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH), mas também se utiliza o Fletcher como meio semi-sólido. Em tubos de rosca contendo meio semi-sólido a visualização do crescimento bacteriano pode ser notado pelo anel de crescimento ou anel de Dinger, que é uma zona turva localizada logo abaixo da superfície do meio, onde se encontra a maior concentração de oxigênio. Já em meios líquidos o crescimento é observado por uma ligeira turbidez, conhecido como “aspecto de fumaça”, quando o tubo é agitado e colocado contra a luz direta (BHARTI et al., 2003; ADLER; MOCTEZUMA, 2010).

O microrganismo possui dupla membrana, sendo a camada exterior composta pelas lipoproteínas antigênicas que dão a característica de virulência de acordo com o sorovar e ainda tem sido relatada a presença de hemolisinas em alguns sorovares. Devido a estas características é possível sua diferenciação em variantes sorológicas, que representam a unidade taxonômica do gênero (BHARTI et al., 2003; DEL FAVA et al., 2003; ADLER; MOCTEZUMA, 2010).

E seguindo essas características, em 2007 o Subcomitê de Taxonomia reorganizou a classificação da *Leptospira* na ordem *Spirochaetales*, família *Leptospiraceae*, gênero *Leptospira* e em uma família com treze espécies patogênicas, 260 sorovares e seis espécies apatogênicas (Quadro 1) (ADLER; MOCTEZUMA, 2010; AYRAL et al., 2014; KHALILI et al., 2014).

Quadro 1: Espécies de *Leptospira* spp. de acordo com a Subcomissão sobre a Taxonomia de *Leptospiraceae*, 2007.

Classificação	Espécie
Patogênicas	<i>L. alexanderi</i> , <i>L. alstonii</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. inadai</i> , <i>L. interrogans</i> , <i>L. fainei</i> , <i>L. kirschneri</i> , <i>L. licerasiae</i> , <i>L. noguchi</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. terpstrae</i> , <i>L. weilii</i> e <i>L. wolffi</i>
Apatogênicas	<i>L. biflexa</i> , <i>L. meyeri</i> , <i>L. yanagawae</i> , <i>L. kmetyi</i> , <i>L. vanthielii</i> e <i>L. wolbachii</i>

Fonte: ADLER; MOCTEZUMA, 2010; AYRAL et al., 2014; KHALILI et al., 2014.

Alguns sorovares possuem afinidade ou predileção por determinadas espécies, mas todos os animais, inclusive o homem, são suscetíveis aos diferentes sorovares. Muitos sorovares de *Leptospira* detectados nos búfalos podem infectar outros animais, mostrando assim que todos estão predisponíveis a contrair a infecção (BHARTI et al., 2003; ABLAS et al., 2007; KONRAD et al., 2013), conforme demonstra o quadro 2. Porém sorovares costumam ser endêmicos em uma região, sendo a infecção determinada pelas espécies animais e pelos sorovares existentes na área e/ou propriedade (ESCÓCIO et al., 2010).

Quadro 2: Hospedeiros susceptíveis a infecção por diferentes sorovares de *Leptospira* spp.

Reservatórios	Sorovares
Suínos	Pomona; Tarassovi
Bovinos e Bubalinos	Hardjo; Pomona
Equínos	Bratislava
Ovinos	Hardjo
Cães	Canicola
Ratos	Icterohaemorrhagiae; Copenhageni

Fonte: BHARTI et al., 2003.

2.3 EPIDEMIOLOGIA

A leptospirose é uma doença infecciosa, de caráter zoonótico, com distribuição geográfica cosmopolita, sendo relatada em animais domésticos e silvestres, os quais funcionam como reservatórios do agente e contribuem para a disseminação do microrganismo na natureza. A doença é mais frequente em regiões tropicais, em razão das características geoclimáticas, como grande volume de chuvas, calor e umidade, que acabam por favorecer a manutenção da bactéria no meio ambiente (OLIVEIRA; GUIMARÃES; MEDEIROS, 2009; SARMENTO et al., 2012; GIRALDO et al., 2014).

A principal forma de transmissão nos bubalinos, assim como nos bovinos, se dá por meio do contato dos animais suscetíveis com água, alimentos, solos e instalações contaminados com a urina de animais com leptospirose. Porém a contaminação pode ocorrer pelo contato com fetos abortados, secreções uterinas, leite contaminado e por meio do coito, uma vez que a bactéria pode estar presente no sêmen (DIAS et al., 2006; GENOVEZ, 2009; KENAR; OZDEMIR, 2013; PETRAKOVSKY et al., 2014).

O búfalo é uma das espécies mais adaptadas a pecuária em áreas tropicais quentes e úmidas, ambiente caracterizado pela presença de rios e solos pântanosos, onde os animais passam a maior parte do tempo se alimentando de pastagens nativas, sendo estas condições ecológicas um possível fator de risco na cadeia de transmissão do agente (ABLAS et al., 2007; KONRAD et al., 2013).

Diversos estudos foram realizados pelo mundo identificando por meio de testes sorológicos, anticorpos contra *Leptospira* em búfalos. SUWANCHAROEN et al. (2013) na Tailândia identificaram soropositividade para os sorovares Mini, Sejroe e Bratislava. Na Turquia em um estudo com 93 búfalos, os autores observaram 32,26% de soropositivos para os sorovares Hardjoprajitino, Grippotyphosa e Icterohaemorrhagiae (KENAR; OZDEMIR, 2013). Já no Iran foram analisadas 189 amostras com 58,73% de amostras positivas para diversos sorovares como Grippotyphosa, Pomona, Icterohaemorrhagiae, Canicola, Ballum e Hardjo (HAJIKOLAEI; GHORBANPOUR; ABDOLLAPOUR, 2006).

Em um estudo realizado por Brasil et al. (2005), se constatou que na América Latina a leptospirose animal apresentou características de endemicidade causando enormes prejuízos econômicos. Essa situação epidemiológica da doença pode estar relacionada a não obrigatoriedade da notificação da leptospirose em animais, a dificuldade em identificar os sorovares circulantes em regiões endêmicas, características geoclimáticas do continente, limitando assim as ações de controle e prevenção da doença (SUWANCHAROEN et al., 2013; GIRALDO et al., 2014).

Petrakovsky et al. (2014) em alguns países da América Latina como Argentina, Brasil, México, Peru e Trinidad e Tobago, identificaram por meio do isolamento do agente, um mesmo sorovar infectando diversas espécies de animais e a infecção espécie específica. Na Argentina, bovinos e suínos infectados pelo sorovar Pomona; no Brasil, caninos infectados pelo sorovar Canicola, bovinos infectados pelos sorovares Canicola, Copenhageni e Grippotyphosa; no México, bovinos infectados pelo sorovar Hardjo; e em Trinidad e Tobago, caninos infectados pelo sorovar Copenhageni.

Adesiyun et al. (2009) realizaram um estudo em Trinidad e Tobago, em que foram pesquisados 226 amostras de búfalos, de cinco fazendas da região, umas com sistema semi-intensivo e outras com sistema extensivo de criação. Estes pesquisadores observaram 14% de animais positivos para os sorovares Bratislava, Australis, Autumnalis, Bim, Ballum, Bataviae, Canicola, Grippotyphosa, Copenhageni, Mankarso, Icterohaemorrhagiae, Georgia, Pomona, Pyrogenes, Wolffi, Tarassovi e Patoc em três fazendas, sendo duas com sistema semi-intensivo e uma com sistema de criação extensiva, tendo uma variação de 14% para 15% de animais positivos dentro destas propriedades respectivamente.

Estudos realizados na Argentina e na Colômbia identificaram soropositividade em búfalos para diversos sorovares como Bratislava, Canicola, Grippotyphosa, Hardjo, Pomona, Pyrogenes, Wolffi e Icterohaemorrhagiae (KONRAD et al. 2013; GIRALDO et al. 2014). De

acordo com Giraldo et al. (2014), a ocorrência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em bubalinos foi maior que a encontrada em bovinos, e este fato pode ser justificado pelo manejo adotado na criação de búfalos nas regiões inundadas de cultivo de arroz, comuns na zona rural da Colômbia, onde existe um contato com a água contaminada pela urina de ratos e espécies silvestres portadoras de *Leptospira* spp.

No Brasil, em vários estados já foram realizados estudos para identificação de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em búfalos. No estado de São Paulo Langoni et al. (1999) testaram 403 amostras e obtiveram 37,70% de soros positivos para os sorovares Wolffii, Icterohaemorrhagiae, Hardjo, com ocorrência de 44,80%, 33,60% e 33,60% respectivamente, seguidos pelos sorovares Castellonis, Djasiman, Grippotyphosa, Pomona, Bratislava, Compenhageni e Tarassovi. Outro trabalho também realizado em São Paulo com 879 bubalinos, os quais foram testados para 24 sorovares de leptospiros patogênicas, observou-se o resultado de 43,70% de animais positivos com destaque para os sorovares Hardjo com 43,30% e Wolffii com 32,50% (FAVERO et al., 2002).

No estado da Paraíba foram pesquisadas 136 amostras de soro bubalino para os sorovares Bratislava, Pomona, Canicola, Patoc, Wolffii e Cynopteri, apresentando 27,90% de sororeagentes, tendo positividade para pelo menos uma amostra em todos os sorovares testados, com destaque para os sorovares Bratislava com 11%, Pomona com 8,80% e Canicola com 5,80% de animais positivos (BRASIL et al., 2005).

No município de São Mateus, no estado do Maranhão, foram pesquisadas 306 amostras de búfalos com resultado positivo de 70,58% para 24 sorovares testados, com positividade para todos os sorovares, Pomona 29,41%, Butembo 25,49%, Icterohaemorrhagiae 24,50%, Sentoti 22,54%, Compenhageni 20,58%, Andamana 20,58%, Castellonis 19,60%, Wolffii 18,62%, Panama 18,62%, Grippotyphosa 17,64%, Patoc 16,67%, Autumnalis 14,70%, Hebdomadis 12,74%, Bataviae e Bratislava 11,76%, Australis, Canicola e Javanica 9,80%, Hardjo e Tarassovi 8,82%, Cynopteri 7,84%, Pyrogenes 5,88%, Shermani 4,90% e Whitcombi 2,94% (CARVALHO et al. 2015).

No estado do Pará em uma pesquisa realizada por Viana et al. (2009) foram testadas 205 amostras de soro de búfalos, oriundos dos municípios de Soure, Cachoeira do Arari, Ipixuna e Nova Timboteua, frente a 27 sorovares, e se observou 80% de animais positivos para algum sorovar, com destaque para o sorovares Autumnalis e Hardjo (Hardjoprajitno) e Wolffii. Os pesquisadores consideraram que a elevada porcentagem de animais reagentes poderia estar ligada ao ineficiente manejo sanitário contra a leptospirose, caracterizado pela

ausência do diagnóstico laboratorial e vacinação preventiva, além da manutenção de animais positivos dentro do rebanho.

É importante a atenção para a espécie bubalina na epidemiologia da leptospirose em zona rural, podendo estes animais atuarem como reservatórios da bactéria, eliminando-as no ambiente pela urina, tornando o búfalo uma fonte potencial de infecção para outras espécies animais assim como para os seres humanos, podendo ser mais comum a infecção em criadores e tratadores dos animais, magarefes e funcionários de frigoríficos que manipulem material contaminado, médicos veterinários e estudantes, o que a torna uma zoonose ocupacional, além de poder infectar pessoas em atividades de lazer e práticas de esportes como o ecoturismo, demonstrando assim a relevância do estudo e do conhecimento da leptospirose na saúde pública (LANGONI et al., 1999; GENOVEZ, 2009; CORRÊA et al., 2013; KENAR et al., 2013; ATHERSTONE; PICOZZI; KALEMA-ZIKUSOKA, 2014).

No Brasil, a característica de endemicidade pode ser vista não só na criação de bubalinos como em outros sistemas de produção de diferentes espécies, em que se tenha a presença de animais positivos para diversos sorovares, podendo ser a infecção cruzada um importante elo da cadeia epidemiológica da leptospirose em búfalos. No estado do Espírito Santo pesquisaram 330 amostras de soro de bovinos e observaram diferentes porcentagens de animais positivos, com 100% para o sorovar Hardjobovis, 78,04%, para Hardjo (Bolívia), 73,17% para Hardjo (Lagoa), 51,21% para Hardjo (Norma), 48,78%, para Hardjo (OMS), 19,51% para Wolffii e não foram encontrados animais soropositivos para os sorovares Pomona e Hebdomadis (VIANA; ZANINI; MOREIRA, 2010).

Para Saldanha et al. (2007) o sorovar Hardjo é o principal agente infeccioso em bovinos por ser este o hospedeiro natural deste sorovar, e que a ocorrência da infecção por outros sorovares, como Australis, Bratislava, Butembo, Castellonis, Grippytyphosa, Copenhageni, Panama, Pyrogenes, Shermani, Andamana e Patoc, são infecções consideradas incidentais, por meio do contato com animais de outras espécies, no chamado manejo consorciado em que diferentes espécies de animais são criadas conjuntamente.

De acordo com Gonçalves e Costa (2011) os suínos são hospedeiros preferenciais dos sorovares Pomona, Bratislava e Tarassovi e funcionam como importantes reservatórios e disseminadores da leptospirose para outras espécies. Favero et al (2002) identificaram em suínos os sorovares Grippytyphosa e Icterohaemorrhagiae em Minas Gerais, Pomona no Rio Grande Sul, Pomona e Icterohaemorrhagiae em Pernambuco e Rio de Janeiro, Autumnalis no Ceará e apenas Icterohaemorrhagiae em Goiás, Paraná, Santa Catarina e São Paulo.

No trabalho realizado por Aguiar et al. (2008) em Rondônia, na Amazônia Ocidental brasileira, foram testados os soros de 176 equídeos, sendo os sorovares mais frequentes Bratislava, Icterohaemorrhagiae, Autumnalis e Patoc. Também trabalhando com soros de equinos de diferentes regiões brasileiras Favero et al. (2002) detectaram o sorovar Icterohaemorrhagiae nos estados do Paraná, Santa Catarina, São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais, o sorovar Grippotyphosa no Mato Grosso, o sorovar Pyrogenes na Paraíba e Patoc no Rio Grande do Sul.

Na espécie canina estudaram 185 amostras oriundas do município de Oriximiná, no estado do Pará, e observaram 18,40% dos animais sororeagentes, sendo os sorovares Canicola, Icterohaemorrhagiae e Compenhageni os mais frequentes, definindo assim as características epidemiológicas da leptospirose canina na zona urbana do município (LILENBAUM; RODRIGUES; BARBOZA, 2000). Já Jouglard e Brod (2000) ao testarem 489 amostras de soro canino, oriundos da zona rural do município de Pelotas, no estado do Rio Grande do Sul, identificaram animais positivos para os sorovares Icterohaemorrhagiae, Australis, Compenhageni, Pyrogenes, Sentot e Canicola, principalmente naqueles que viviam em propriedades próximas da estrada, em baixa altitude e com áreas alagadas.

2.4 PATOGENIA

As portas de entrada do microrganismo no hospedeiro são a pele integra ou com abrasões, conjuntiva e mucosas oral, nasofaríngea e genital. Os búfalos são infectados pela *Leptospira* assim como os bovinos, porém por poderem permanecer maior tempo submersos em água, favorecem à penetração devido a eliminação de barreiras naturais protetoras da pele (BRASIL et al., 2005; GENOVEZ, 2009; GIRALDO et al., 2014; CARVALHO et al., 2015).

Após a penetração no organismo animal a *Leptospira* se dissemina rapidamente por via linfática e sanguínea, dependendo da virulência do sorovar envolvido, e se multiplica rapidamente no organismo do hospedeiro, caracterizando a fase de leptospiremia, atingindo vários órgãos e tecidos, como fígado, baço, rim, sistema nervoso central, órgãos reprodutivos, membranas fetais, feto, glândula mamária, testículos, epidídimo e vesículas seminais. Já os sorovares não patogênicos são destruídos rapidamente pela fagocitose reticulo-endotelial (MARIANELLI et. al., 2007; GENOVEZ, 2009; GIRALDO et al., 2014).

Em torno de cinco a sete dias após a infecção os primeiros sinais e sintomas começam a aparecer, podendo ocorrer lesões primárias, como danos ao endotélio de pequenos vasos sanguíneos, causando isquemia localizada nos órgãos afetados. Também se inicia a produção

de anticorpos anti-*Leptospira*, sendo a resposta humoral o principal mecanismo de defesa contra a leptospirose, caracterizados pela imunoglobulina M (IgM), sintetizadas na tentativa de debelar a infecção. Nesta fase a multiplicação bacteriana diminui ou cessa, podendo o hospedeiro se recuperar ou vir a óbito, que pode ocorrer pelo efeito da intensa multiplicação bacteriana e liberação de toxinas no organismo do animal ou pelas lesões decorrentes da infecção (HAANWINCKEL; MEGID; SOUZA, 2004; GENOVEZ, 2009; ADLER; MOCTEZUMA, 2010).

Os animais que sobrevivem à fase aguda da doença, as bactérias permanecem vivas em sítios imunologicamente protegidos, como túbulos renais proximais, câmara anterior do olho e trato genital, tornando-se portadores renais ou genitais, e importantes fontes de difusão da infecção para novos suscetíveis, caracterizando a fase de leptospiúria, em que a bactéria multiplica-se e é eliminada pela urina, e a fase crônica da doença, onde podemos detectar imunoglobulinas G (IgG) no hospedeiro, que provocam lise de *Leptospira* circulante, mas é o animal assintomático que irá liberar a bactéria no ambiente dando origem a novos casos e perpetuando a cadeia epidemiológica da doença (HAANWINCKEL; MEGID; SOUZA, 2004; GENOVEZ, 2009).

2.5 SINAIS CLÍNICOS

Os sinais clínicos podem ser observados tanto na infecção aguda ou crônica, e nos búfalos assim como nos bovinos a maioria das infecções são determinadas pelos sorovares Hardjo, Pomona, Grippotyphosa e Icterohaemorrhagiae (GENOVEZ, 2009; CHIARELI et al., 2012). Sendo o sorovar Hardjo o mais importante por desencadear alterações reprodutivas no rebanho (SALDANHA et al., 2007).

De acordo com Brode e Fehlberg (1992), a apresentação clínica varia de acordo com a idade do animal, tendo nos animais jovens características mais graves de fase aguda como febre, icterícia e hemoglobinúria, em fêmeas adultas os principais sinais clínicos são abortos e mamites, o que caracteriza uma maior perda econômica relacionada às fêmeas. As fêmeas que não estiverem gestantes ou em lactação tendem a seguir o curso da doença de forma assintomática evoluindo para a fase crônica.

A leptospirose pode desenvolver vários sinais e sintomas, animais doentes podem apresentar hipertermia, icterícia e hemorragias. No gado leiteiro pode-se observar mamite clínica e subclínica, acarretando na síndrome da queda do leite caracterizada por redução na produção de leite que dura de dois a dez dias, com alterações no aspecto do leite que fica

amarelado, com consistência de colostro, presença de grumos grosseiros e aumento na contagem de células somáticas, além do aparecimento de quadros de mamite flácida com agalactia e pequena quantidade de sangue no leite (RODRIGUES; MULLER; FREITAS, 1999; VASCONCELLOS et. al., 2001; GENOVEZ, 2009; SUWANCHAROEN et al., 2013; PETRAKOVSKY et al., 2014).

Em fêmeas prenhes após a fase de leptospiremia, as bactérias podem atingir o útero e o feto causando morte fetal e aborto em torno de 24 horas, assim como pode ocorrer casos em que o aborto ocorre no terço final da gestação, causando a morte fetal, com ou sem degeneração da placenta, sendo o feto expulso semanas após a infecção (GENOVEZ, 2009; BRASIL et. al., 2015).

Animais que sobrevivem após a fase aguda da doença, apresentam sinais característicos da fase crônica como alterações no aparelho reprodutivo. Nas fêmeas pode-se observar colonização persistente do útero e tubas uterinas que pode estar associado com a infertilidade temporária, abortos, natimortos, nascimento de bezerros fracos com dificuldade de ganho de peso. Nos machos podem ocorrer lesões graves nos tecidos do testículo, epidídimo e vesículas seminais. Podem ser observados animais assintomáticos, que assumem o papel de portador e difusor da doença. Quando este animal encaminhado para o abate é identificado pelo veterinário da inspeção, lesão renal, sendo este um achado que pode levar a suspeita da doença de acordo com o histórico da propriedade de origem deste animal abatido (GENOVEZ, 2009; PETRAKOVSKY et al., 2014).

2.6 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da leptospirose bubalina deve ser baseado na associação do histórico da propriedade, sinais clínicos e o diagnóstico laboratorial. O procedimento a ser adotado para realização do diagnóstico dependerá da escolha e realização adequada da técnica, assim como diversos fatores que afetam a qualidade dos exames como fase da doença, qualidade do material coletado, coleção de antígenos utilizada, variáveis relacionadas à localização das propriedades, período do ano em que as coletas das amostras foram efetuadas e da movimentação dos animais. Para minimizar estes fatores é importante adotar um sistema de vigilância epidemiológica permanente, que permitirá o monitoramento dos sorovares que ocorrem no rebanho analisado (BRASIL, 1995; FAVERO et al. 2002).

Para realização dos testes diagnósticos, podem ser adotados métodos diretos que consistem na demonstração do agente, assim como métodos indiretos através de provas

sorológicas para a detecção de anticorpos, sendo os testes sorológicos os mais indicados para o controle em rebanhos. A detecção de anticorpos anti-*Leptospira* spp. pode ser feita por meio de testes como o teste de soroaglutinação microscópica (SAM) e ensaio imunoenzimático (ELISA). O teste de SAM é o método padrão oficial recomendado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) para realização do diagnóstico da leptospirose em animais e seres humanos (COLE; SULZER; PURSELL, 1973; SARMENTO et al., 2012; KHALILI et al., 2014).

O teste de SAM possui suas particularidades, por ser um teste sensível, que detecta a reação antígeno-anticorpo através da utilização do antígeno vivo, o que permite a detecção do sorovar que esta acometendo o rebanho, mas também um teste com risco de contaminação para quem o executa sem medidas de biossegurança. Sua qualidade e eficiência ficam comprometidas quando não se tem uma diluição correta dos soros e uma incubação com tempo e temperatura adequada, além de uma coleção de antígenos cultivada e mantida de forma correta (KHALILI et al., 2014). É importante que se tenha na coleção de antígenos empregada pelo menos um sorovar representante de cada sorogrupo, e se possível a utilização de sorovares autóctones isolados no país ou região, aumentando a qualidade e a precisão do teste (SARMENTO et al., 2012).

Varias técnicas diretas de diagnóstico podem ser utilizadas para realização do diagnóstico da leptospirose. A microscopia de campo escuro consiste na observação do agente, identificando a motilidade típica do gênero em amostras de urina na fase de leptospiúria, que fornece resultado imediato, porém resultados falsos negativos podem acontecer quando se tem pouco microrganismo na amostra ou presença de detritos e restos celulares que possam prejudicar na visualização no microscópio (BRASIL, 1995).

Outro método de detecção direta é a impregnação pela prata, como a técnica de Levandite e a Warthin Starry, em que a *Leptospira* apresenta-se corada em castanho-escuro sobre um fundo castanho-claro. É importante ressaltar que o material deve ter o mínimo de detritos possível, porém alguns autores mostram-se controversos a técnica, alguns citam dificuldades, como problemas na estabilidade dos reagentes, alto custo, falhas na identificação da bactéria, e outros defendem que é uma prova rápida, de menor custo e de boa estabilidade (BRASIL, 1995; HAANWINCKEL; MEGID; SOUZA, 2004).

O teste de imuno-histoquímica também pode ser utilizado para identificação do agente e também como técnica alternativa à técnica de imunofluorescência, que pode apresentar artefatos oriundos de substancias fluorescentes. Pode ser útil como recurso diagnóstico de

infecção em amostras de tecidos contaminados que são fixados e processados para a utilização desta técnica, esfregaços sanguíneos ou cultivo de tecido e que não são adequados para o isolamento do agente. O agente é identificado por meio da interação antígeno-anticorpo, com o anticorpo marcador sendo conjugado com determinantes antigênicos na amostra. O sucesso desta técnica depende da concentração dos agentes no material analisado, e se o agente estiver fragmentado ou em presença de outras bactérias sua visualização somente será possível caso a fixação tenha sido realizada de maneira correta (HAANWINCKEL; MEGID; SOUZA, 2004; OIE, 2014).

O isolamento da bactéria é muito demorado, sendo necessárias até 13 semanas de incubação. É um dos métodos mais específicos, sendo necessário material de boa qualidade para um resultado eficiente, sendo coletado e armazenado de forma correta, para evitar crescimento excessivo de bactérias competidoras e autólise. Os meios de cultura utilizados para cultivo são a albumina sérica bovina e os meios semi-sólidos de Fletcher adicionados com o antimicrobiano 5-fluorouracil, utilizados para manter a sobrevivência da *Leptospira* por um tempo maior, o que torna a técnica mais onerosa. As culturas devem ser examinadas por microscopia de campo escuro a cada uma a duas semanas. Devido ao longo tempo utilizado para realização desta técnica a OIE preconiza o técnica de soroglutinação microscópica (RYU; LIU, 1968; MARIANELLI et. al., 2007; ADLER; MOCTEZUMA, 2010; KHALILI et al., 2014).

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) tem sido utilizada para diferenciar sequência de bases de DNA, revelando diferenças entre leptospiros do mesmo grupo e/ou mesmo sorovares, a partir da utilização de amostras de sangue, líquido encéfalo raquidiano, urina e sêmen, amostras teciduais coletadas na necropsia como rim, fígado, baço e aparelho reprodutor, dos quais é realizada a extração de DNA. A técnica de PCR necessita de treinamento e possui um custo elevado, tendo as características de especificidade e sensibilidade variando de acordo com a amostra utilizada. Já a técnica de PCR em tempo real é mais rápida do que a técnica de PCR convencional e menos propenso a contaminação (MARIANELLI et. al., 2007; CORRÊA et al., 2013; MARTINS et al., 2014; OIE, 2014).

2.7 PROFILAXIA E CONTROLE

O sucesso da profilaxia e o controle da leptospirose dependem intimamente da identificação do sorovar predominante na propriedade. No caso de infecções determinadas por

sorovares que não são mantidos por bubalinos, como Pomona, Icterohaemorrhagiae ou Bataviae, assim como outros sorovares, é importante identificar a fonte de infecção em casos de criação em consórcio ou criações extensivas, em que os animais têm livre acesso a outros reservatórios naturais destes sorovares. Diante disso devem ser adotadas medidas higiênico-sanitárias, como, por exemplo, a vacinação, e a tecnificação da criação como a utilização de sistema semi-intensivo de criação minimizando o contato com animais silvestres e outros animais potenciais reservatórios destes sorovares para que possa controlar a leptospirose no rebanho (DEL FAVA et al.,2003; NARDI JUNIOR et al., 2006).

Quando a infecção ocorre pelo sorovar Hardjo, sorovar com afinidade para bubalinos, três medidas básicas devem ser praticadas tais como: proibir a introdução de novos animais no rebanho; isolar e tratar os animais sororeagentes do rebanho com dihidroestreptomicina, veterinários a campo tem utilizado dose de 50 mg/kg PV e obtendo resultados positivos no tratamento, no entanto na literatura a dose é de 25mg/kg PV, em dose única e; imunização com vacina contendo os principais sorovares frequentes na região, incluindo, se possível, amostras locais. É necessário adotar o sorodiagnóstico anualmente como medida de monitoramento do status sanitário do rebanho (DEL FAVA et al.,2003; CHIARELI et al., 2012).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ESPÉCIMES CLÍNICOS

Foi utilizado um total de 387 amostras de soros sanguíneos de búfalos, criados no bioma amazônico do Estado do Pará (tabela 1) pertencentes ao banco de soros do Hospital de Medicina Veterinária, Setor de Grandes Animais, Instituto de Medicina Veterinária, da Universidade Federal do Pará (UFPA – Castanhal).

Tabela 1: Número de amostras de soro sanguíneo de búfalos, por município e sexo, pertencentes ao banco de soro do Hospital Veterinário da UFPA.

Município	Estado	Espécie	Raça	Quantidade	
				Fêmea	Macho
Abaetetuba	PA	Bubalina	Murah	04	04
Cachoeira do Arari	PA	Bubalina	Murah	60	-
Chaves	PA	Bubalina	Murah	60	-
Ipixuna	PA	Bubalina	Murah	-	16
Nova Timboteua	PA	Bubalina	Murah	-	03
Paragominas	PA	Bubalina	Murah	60	-
Salvaterra	PA	Bubalina	Murah	60	-
Santa Cruz do Arari	PA	Bubalina	Murah	60	-
Soure	PA	Bubalina	Murah	60	-
TOTAL				364	23
GERAL				387	

De cada município estudado, tanto os pertencentes à região da Ilha de Marajó quanto à área continental do Estado do Pará, utilizou-se 60 amostras, exceto nas cidades em que não havia um n amostral de 60, onde foram utilizadas todas as amostras disponíveis, como acontece com Abaetetuba, Ipixuna e Nova Timboteua.

De acordo com os dados epidemiológicos e históricos das propriedades, onde foram obtidas as amostras de sangue, a coleta de sangue foi feita em 387 de animais criados em sistema extensivo, com alimentação a base de forrageira e sem relato de suplementação mineral regular animais, no final do segundo semestre de 2014 e início do primeiro semestre de 2015, período caracterizado pelo início da estação chuvosa na região.

3.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS

Para detecção dos anticorpos anti-*Leptospira* spp. foi realizado o teste de soroaglutinação microscópica (SAM), considerado padrão ouro para identificação de anticorpos neutralizantes contra *Leptospira* (KHALILI et al., 2014). Todos os procedimentos laboratoriais foram realizados no Laboratório de Leptospirose do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG.

3.2.1 Teste de Soroaglutinação Microscópica (SAM)

Os sorovares do gênero *Leptospira* (quadro 3) eram mantidos em meio Ellinghausen, McCollough, Johnson e Harris (EMJH) acrescido de 10% de soro albumina bovina e mantidos em estufa bacteriológica a 28°C. O controle macroscópico do crescimento bacteriano foi realizado a “olho nu”, observando sob luz baixa, após um movimento mecânico leve de turbilhão agitando o tubo, a opalescência de cada meio de cultura que foi testado, gerando assim um aspecto de “fumaça”.

Os antígenos foram diluídos na SST e examinados antes de sua utilização. Apenas foram utilizados como antígenos, aqueles com culturas de quatro a sete dias e que não apresentavam contaminantes nem auto-aglutinação (COLE; SULZER; PURSELL, 1973). Após a diluição, através de alça bacteriológica, cada amostra de antígeno foi transferida para uma lâmina e examinada sem lamínula, em microscópio de campo escuro, com objetiva 10x e ocular 10 a 16x. Para ser considerada em concentração satisfatória, a suspensão deveria se apresentar ocupando todo o campo microscópico com uma fina camada de *Leptospiras* individualizadas. Nesse momento também eram avaliadas a pureza e possíveis auto-aglutinações.

Quadro 3: Amostras *Leptospira* spp. utilizadas na execução dos testes de SAM.

SOROGRUPO	SOROVAR	CEPAS
Bataviae	Bataviae	Swart
Australis	Bratislava	Jez Bratislava
Sejroe	Hardjobovis	Hardjobovis
Sejroe	Hardjo (CTG)	Hardjoprajitino
Sejroe	Hardjo (OMS)	Hardjoprajitino
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	Rga
Pomona	Pomona	Pomona
Sejroe	Hardjo (bolivia)	Hardjobovis

Fonte: University of Belgrade & Royal Tropical Institute, Amsterdam 1997; CHIARELI et al., 2012.

Foi adicionada solução salina tamponada (SST) com pH 7,2, em tubos de ensaio devidamente identificados para cada amostra testada, onde os soros foram diluídos. O teste de SAM foi realizado em placas de poliestireno com 96 poços, devidamente identificadas, onde foram adicionados em cada poço 50µL do soro diluído em SST, mais 50µL do antígeno examinado anteriormente, diluído também em SST, obtendo uma diluição final de 1:100. Posteriormente as placas foram homogeneizadas e encaminhadas para estufa bacteriológica a 37° C por no mínimo 2 horas, para que ocorresse a reação de aglutinação entre o antígeno e o anticorpo. Após a reação de aglutinação, as placas foram colocadas na plataforma de um microscópio de campo escuro, e procedido a leitura, de acordo com o grau de aglutinação de uma cruz até quatro cruces, adotando-se o critério apresentado no quadro 4.

Quadro 4: Critérios adotados na interpretação da reação de aglutinação no teste de SAM

RESULTADO	INTERPRETAÇÃO
Negativo	Ausência de aglutinação, com número de células idêntico ao controle
1+	Presença de aglutinação, com 75% de leptospiras livres
2+	Presença de aglutinação, com 50% de leptospiras livres
3+	Presença de aglutinação, com 25% de leptospiras livres
4+	Presença de aglutinação abaixo de 25% de células livres

Fonte: BRASIL, 1995.

O soro que aglutina somente em grau uma cruz, correspondendo a 25% das *Leptospiras* que aglutinaram, é também considerado negativo, sendo somente considerado positivo, quando acima de duas cruces (BRASIL, 1995).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total de 387 búfalos amostrados 354 (91,50%) foram sorologicamente positivos, sendo que apenas 33 (8,50%) animais foram negativos na detecção de anticorpos anti-*Leptospira* spp. por meio do teste de SAM. Todos os municípios estudados apresentaram animais reagentes conforme dados compilados na tabela 2.

Tabela 2: Número e porcentagem de animais positivos e negativos na detecção de anticorpos anti-*Leptospira* spp. por meio do teste de SAM, por município amostrado.

Município	Reagentes		Não reagentes		Total
	Numero	Porcentagem	Numero	Porcentagem	
Abaetetuba	07	87,50%	01	12,50%	08
Cachoeira do Arari	58	96,60%	02	3,40%	60
Chaves	58	96,60%	02	3,40%	60
Ipixuna	14	87,50%	02	12,50%	16
Nova Timboteua	03	100%	00	-	03
Paragominas	50	83,30%	10	16,70%	60
Salvaterra	56	93,30%	04	6,70%	60
Santa Cruz do Arari	50	83,30%	10	16,70%	60
Soure	58	96,60%	02	3,40%	60
TOTAL	354	91,50%	33	8,50%	87

O elevado percentual de animais soro reagentes encontrado no presente estudo pode estar diretamente ligado à ocorrência da leptospirose em zonas tropicais, onde se localiza a América Latina, que possui características de endemicidade para a doença (BRASIL et al., 2005). Em especial o bioma amazônico paraense, área foco desta pesquisa, que apresenta alto índice pluviométrico, variando de 20-25%, umidade acima de 80% e temperatura média anual de 26 °C (MORAES et al., 2005). São fatores que favorecem a manutenção da bactéria no ambiente e aumentam os riscos de transmissão da leptospirose, favorecendo assim toda a cadeia epidemiológica do agente (SARMENTO et al., 2012).

Estudos anteriores realizados em bubalinos no Brasil também corroboram com os dados observados, de que a leptospirose ocorre em várias regiões brasileiras, porém em menores proporções como observado no estado da Paraíba com 27,9% de animais positivos, São Paulo com 37,7%, Maranhão com 70,58% e Pará com 80% (FAVERO et al., 2002; BRASIL et al., 2005; VIANA et al., 2009; CARVALHO et al. 2015).

De acordo com a tabela 2 os índices de animais reagentes são elevados em todos os municípios pesquisados. Pode-se observar que há ocorrência da infecção nas duas regiões estudadas do bioma Amazônico paraense, mesmo possuindo características diferentes, sendo

a Ilha de Marajó rica em rios, várzeas e lagos comparada aos municípios localizados no continente do estado.

Levando em consideração o número de amostras analisadas por municípios, os que apresentaram maior ocorrência de anticorpos anti-*Leptospira* foram Cachoeira do Arari, Chaves e Soure, todos localizados na Ilha de Marajó, onde segundo Barbosa (2005) e Viana et al. (2009) apresentam condições adequadas para a manutenção da *Leptospira* no ambiente. Este fato é explicado pelas características geoclimáticas favoráveis, associadas ao sistema de produção de bubalinos, em que não são adotadas técnicas de manejo higiênico-sanitário, criações em sistema ultra-extensivo e em associação com diferentes rebanhos e espécies animais, pela inexistência de cercas nas propriedades, o que acabam por favorecer a propagação da leptospirose dentro rebanho bubalino da Ilha de Marajó.

Outros fatores que podem estar associados à ocorrência da leptospirose em bubalinos no bioma Amazônico paraense são a presença e o contato com os animais silvestres, possíveis reservatórios do microrganismo (GIRALDO et al., 2014). Estes animais podem contaminar hospedeiros suscetíveis, como o búfalo e outras espécies domésticas, que são criados em consórcio (BARBOSA, 2005). Em contrapartida os búfalos do ponto de vista epidemiológico também podem funcionar como importantes reservatórios e disseminadores da leptospirose, por possuírem comportamento de permanecerem imersos na água. A água é uma importante via de contaminação de novos hospedeiros, por veicular a bactéria, e por ser o bioma Amazônico paraense, em sua maioria constituída por rios e lagos, aumenta-se assim o fator de risco da difusibilidade da leptospirose entre as diferentes espécies, incluindo o ser humano, fazendo assim com que o búfalo, possa a ser um elo na cadeia de transmissão dessa antroponose (ABLAS et al., 2007; KONRAD et al., 2013).

Na tabela 3 são apresentados os dados de soropositividade frente a cada um dos sorovares utilizados no teste de SAM, o que nos permite comparar quais os sorovares foram mais prevalentes na região de estudo.

Tabela 3: Número e porcentagem de soros reagentes pelo teste de SAM para os sorovares de *Leptospira* spp., 2015.

Sorovar	Animais reagentes	
	Número de animais	Porcentagem
Bataviae	09	2,30%
Bratislava	47	12,10%
Hardjo bovis	248	64,10%
Hardjo CTG	111	28,60%
Hardjo OMS	251	64,80%
Icterohaemorrhagiae	16	4,10%
Pomona pomona	179	46,20%
Bolivia	307	79,30%

Foram observados três sorovares do sorogrupo Sejroe apresentando maiores índices de resultados positivos, sendo o sorovar Hardjo (bolivia) com 79,30% (307/387) de búfalos reagentes, seguido pelos sorovares Hardjo (OMS) e Hardjobovis, com resultados de 64,80% e 64,10% respectivamente. O sorovar Hardjo (CTG) teve percentual de 28,60%, sendo o de menor ocorrência do sorogrupo Sejroe. Este resultado está de acordo com o que Genovez (2009) e Chiareli et al. (2012) afirmam em seus estudos de que a infecção em bovinos e bubalinos pela leptospirose, é determinada de forma predominante pelo sorovar Hardjo.

O sorovar Bolivia é um sorovar isolado de rebanhos bovinos do Brasil, e nunca tinha sido testado anteriormente em rebanhos bubalinos no Bioma Amazônico Paraense. E com a maior porcentagem encontrada deste sorovar em relação aos outros sorovares testados, sugere a infecção cruzada entre as espécies bovina e bubalina, além da importância da utilização deste sorovar na bateria de testes sorológicos para leptospirose no rebanho e atenção aos métodos de controle e profilaxia para minimizar a infecção com este sorovar (CHIARELI et al., 2012; SARMENTO et al., 2012)

Quando comparado especificamente ao trabalho de Viana et al. (2009), também realizado no bioma Amazônico, estado do Pará, observa-se uma ocorrência de 11,50% a mais de animais positivos para leptospirose. Outra diferença entre os dois estudos reside no número de sorovares testados por meio da técnica de SAM. Viana et al. (2009) trabalharam apenas com o sorovar Hardjo (Hardjoprajitno) do sorogrupo Sejroe, sendo considerado o mais frequente, em contrapartida, no presente estudo foram utilizados os sorovares Hardjobovis, Hardjo (CTG), Hardjo (OMS) e Hardjo (Bolivia) também do sorogrupo Sejroe, também com resultados expressivos, sugerindo assim a importância da utilização de vários sorovares na investigação sorológica do rebanho, identificando assim os que mais ocorrem nas regiões afetadas, otimizando as medidas profiláticas e de controle a serem adotadas (ESCÓCIO et al. 2010; SARMENTO et al. 2012).

A maior ocorrência do sorovar Hardjo, além de comprovar a predileção deste pela espécie bubalina, demonstra a possibilidade do búfalo ser reservatório e potencial disseminador do agente no plantel bubalino e também bovino, quando criados em consorciação, ou a via contrária, uma vez os bovinos também albergam este sorovar (SALDANHA et al. 2007). O resultado observado de que o sorovar Hardjo (CTG), foi o menos prevalente dentro do sorogrupo Sejroe, sugere que ele ainda não esteja totalmente disseminado nas populações de búfalos no bioma Amazônico paraense, apesar do grande trânsito de animais no Brasil.

O sorovar Pomona com 46,20% de animais positivos também parece ter importância para a espécie bubalina, assim como relatado por Genovez (2009). A ocorrência observada deste sorovar no estado do Pará foi maior que os estudos realizados em outros estados como São Paulo, Paraíba e Maranhão (FAVERO et al. 2002; BRASIL et al. 2005; CARVALHO et al. 2015). O sorovar Pomona possui como hospedeiro definitivo e reservatório os suínos (GONÇALVES; COSTA, 2010), cativos e outros animais silvestres. Devido às características dos sistemas de criação de bubalinos no bioma amazônico paraense, baseados no manejo ultra-extensivo, alcançando regiões de floresta densa, utilização de criações consorciadas torna mais fácil o contato dos búfalos com estes animais reservatórios, o que pode explicar o percentual elevado encontrado no presente estudo, devido a infecção cruzada com hospedeiros definitivos (FAVERO et al., 2002; GIRALDO et al., 2014).

Outros sorovares, como Bratislava, apresentaram ocorrência menor, 12,10% de búfalos reagentes, em relação aos sorovares Hardjo e Pomona, mais ocorrentes, porém a detecção de animais positivos indica a ocorrência destes no bioma Amazônico paraense e a possível importância epidemiológica relacionada à espécie bubalina que pode servir como reservatório e potencial disseminador destes sorovares (BHARTI et al. 2003). Este resultado para o sorovar Bratislava corrobora com estudos anteriores realizados com búfalos no estado da Paraíba com 11,00% de animais positivos e Maranhão com 11,76% (BRASIL et al. 2005; CARVALHO et al. 2015). De acordo com Bharti et al (2003) o equino é suscetível e um possível hospedeiro definitivo do sorovar Bratislava, o que foi comprovado por Aguiar et al. (2008), que observaram a maior frequência deste sorovar nos equinos testados. Sendo a equideocultura disseminada por todas as regiões do Brasil, inclusive no estado do Pará, com criações mistas de bubalinos e equídeos, a possibilidade de infecção cruzada entre as espécies deve ser considerada do ponto de vista epidemiológico e de controle da leptospirose.

Langoni et al. (1999) no estado de São Paulo e Carvalho et al. (2015) no Maranhão encontraram búfalos sororeagentes para o sorovar *Icterohaemorrhagiae* em índices mais elevados dos que o presente estudo, de 33,60% e de 24,50%, respectivamente. No Maranhão Carvalho et al. (2015), encontraram 11,76% de búfalos reagentes para o sorovar *Bataviae*, ocorrência superior a encontrada no presente estudo de 2,30%. Os sorovares *Icterohaemorrhagiae* e *Bataviae* podem ter como reservatórios roedores e caninos (BHARTI et al., 2003; JOUGLARD; BROD, 2000; LILENBAUM et al., 2015). O que pode justificar a menor ocorrência destes sorovares no presente estudo é o fato de que cães e roedores costumam estar próximos às fontes de alimento e estradas, localizadas normalmente nas sedes das propriedades ou em locais de depósitos de ração. E sendo as criações paraenses predominantemente de forma extensiva, esse contato maior dos búfalos com estes animais se torna mais difícil, o que se reflete em uma menor detecção neste estudo dos sorovares *Icterohaemorrhagiae* e *Bataviae*.

No presente estudo foram utilizados sorovares não pesquisados anteriormente, como a pesquisa de Viana et al. (2009), realizado no estado do Pará em bubalinos, como os sorovares *Hardjobovis*, *Hardjo* (CTG), *Hardjo* (OMS) e *Hardjo* (Bolívia). Para Del Fava et al. (2003) e Chiareli et al. (2012) é importante a identificação dos sorovares que estejam infectando o rebanho para que se possa fazer a adoção das melhores e mais acertadas medidas de profilaxia e controle. No presente estudo identificou-se a maior ocorrência do sorogrupo *Sejroe* e suas variantes em nove municípios do Bioma Amazônico Paraense e a maior ocorrência na região da Ilha de Marajó, sendo, portanto, muito importantes estes dados para direcionar as medidas de combate e controle da leptospirose no rebanho bubalino dessas regiões.

A adoção correta das medidas sanitárias, partindo do princípio do conhecimento do agente que acomete o rebanho na região, minimiza os impactos negativos que a leptospirose possa acarretar como as perdas produtivas e reprodutivas, além da diminuição na possibilidade de ocorrência da zoonose para os grupos de risco como proprietários, tratadores, médicos veterinários, funcionários de frigorífico entre outros.

5. CONCLUSÃO

Foi possível identificar a ocorrência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em 91,50% dos animais amostrados, frente aos oito sorovares testados. Observou-se que variantes do sorogrupo Sejroe foram as mais frequentes no rebanho bubalino, porém todos os outros sorovares também foram detectados. Dentre os sorovares testados o sorovar Bolivia ocorreu em 79,3% das amostras, sugerindo a predominância deste sorovar no rebanho bubalino estudado. Ambas as regiões estudadas, Ilha e Continental, demonstraram altos percentuais de animais positivos, sendo, portanto o búfalo um possível elo na cadeia epidemiológica da doença no Bioma Amazônico do estado do Pará. Diante disso são necessárias adoção de medidas higiênico-sanitárias para o controle da leptospirose, com maior atenção para os sorovares de maior ocorrência, a fim de se evitar ou minimizar os impactos negativos causados por esta doença.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABLAS, D.S. et al. Comportamento de bubalinos a pasto frente à disponibilidade de sombra e água para imersão. **Ciênc. Anim. Bras.** v.8, n.2, p.167-175, 2007.

ADESIYUN, A.A. et al. Leptospirosis in water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Trinidad. **Vet. Arhiv.** v.79, n.1, p.77-86, 2009.

ADLER, B.; MOCTEZUMA, A.P. Leptospira and leptospirosis. **Vet. Microbiol.** v.140, p. 287-296, 2010.

AGUIAR, D.M. Prevalência de anticorpos contra agentes virais e bacterianos em equídeos do município de Monte Negro, Rondônia, Amazônia Ocidental brasileira. **Braz. J. vet. Res. Anim. Sci.** v.45, n.4, p.269-276, 2008.

ATHERSTONE, C.; PICOZZI, K.; KALEMA-ZIKUSOKA, G. Short report: Seroprevalence of *Leptospira* Hardjo in cattle and african buffalos in Southwestern Uganda. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.90, n.2, p.288-290, 2014.

AYRAL, F.C. et al. Short report: Distribution of *Leptospira* Serogroups in Cattle Herds and Dogs in France. **The Amer. J. of Trop. Med. and Hyg.** v.91, n.4, p.756-759, 2014.

BARBOSA, N.G.S. Bubalinocultura no Estado do Pará. **Rev. Bras. de Rep. Anim.** v.29, n.1, p.34-38, 2005.

BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. **Rev. Bras. de Rep. Anim.** v.31, n.3, p.293-298, 2007.

BHARTI, A.R. et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lanc. Infect. Dis.** v.3, p.757-771, 2003.

BRASIL. **Manual de Leptospirose.** Brasília. Ministério da Saúde. 1995.

BRASIL, A.W.L. et al. Ocurrence of anti-*Brucella* abortus and anti-*Leptospira* spp. antibodies in buffaloes from Paraíba state, Northeastern Brazil. **Semina: Ciênc. Agr.** v.36, n.3, p.2005-2012, 2015.

BROD, C.S.; FEHLBERG, M.F. Epidemiologia da leptospirose bovina. **Ciênc. Rur.** v.22, n.2, p.239-245, 1992.

CARVALHO, O.S. et al. Occurrence of *Brucella abortus*, *Leptospira interrogans*, and bovine herpesvirus type 1 in buffalo (*Bubalus bubalis*) herd under extensive breeding system. **Afr. J. of Microbiol. Res.** v.9, n.9, p.598-603, 2015.

CHIARELI, O. et al. Controle da leptospirose em bovinos de leite com vacina autógena em Santo Antônio do Monte, Minas Gerais. **Pesq. Vet. Bras.** v.32, n.7, p.633-639, 2012.

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

CORRÊA J.M.X. et al. Molecular Research of *Leptospira spp.* in Kidneys of Cattle. **Act. Scient. Vet.** v.41, p.1-6, 2013.

CUNHA NETO, O.C. et al. Avaliação físico-química e sensorial do iogurte natural produzido com leite de búfala contendo diferentes níveis de gordura. **Ciênc. Tecnol. de Alim.** v.25, n.3, p.448-458, 2005.

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

DIAS, F.E.F. et al. Detecção de *Leptospira pomona* em sêmem bovino por eletroforese capilar fluorescente. **Braz. J. vet. Res. Anim. Sci.** v.43, n.3, p.394-399, 2006.

ESCÓCIO, C. et al. Influencia das condições ambientais na transmissão da leptospirose entre criações de ovinos e bovinos da região de Sorocaba, SP. **Arq. Inst. Biol.** v.77, n.3, p.371-379, 2010.

FAVERO, A.C.M. et al. Sorovares de leptospirosas predominantes em exames sorológicos de bubalinos, ovinos, caprinos, equinos, suínos e cães de diversos Estados brasileiros. **Ciênc. Rur.** v.32, n.4, p.613-619, 2002.

GENOVEZ, M.E. Leptospirose: uma doença de ocorrência além da época das chuvas!. **Biol.** v.71, n.1, p.1-3, 2009.

GIRALDO, J.L.M. et al. Prevalencia de anticuerpos a *Brucella abortus*, *Leptospira sp.* y *Neospora caninum* em hatos bovinos y bubalinos en el Departamento de Caquetá, Colombia. **Ver. Salud Anim.** v.36, n.2, p.80-89, 2014.

GONÇALVES, L.M.F; COSTA, F.A.L. Leptospiroses em suínos no Brasil. **Rev. de Patol. Trop.** v.40, n.1, p.1-14, 2011.

HAANWINCKEL, M.C.S.; MEGID, J.; SOUZA, L.C. Avaliação da prova de imunoperoxidase como recurso diagnóstico na leptospirose animal. **Arq. Inst. Biol.** v.71, n.3, p.293-301, 2004.

HAIKOLAEI, M.R.H.; GHORBANPOUR, M.; ABDOLLAPOUR, G. Seroprevalence of leptospiral infection in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Bull Vet. Inst. Pul.** v.50, p.341-344, 2006.

IBGE, Produção da Pecuária Municipal. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. v.41, 2013.

JORGE, A.M. Produção de carne bubalina. **Rev. Bras. de Rep. Anim.** v.29, n.2, p.84-95, 2005.

JOUGLARD, S.D.D.; BROD, C.S. Leptospirose em cães: Prevalência e fatores de risco no meio rural do município de Pelotas, RS. **Arq. Inst. Biol.** v.67, n.2, p.181-185, 2000.

KHALILI, M. et al. Seroprevalence of Bovine Leptospiral Antibodies by Microscopic Agglutination Test in Southeast of Iran. **Asi. Pac. J. of Trop. Biom.** v.5, n.4, p.354-357, 2014.

KENAR, B.; OZDEMIR, V. The seroprevalence of leptospirosis in Anatolian buffaloes Turkey. **Revue Méd. Vét.** v.164, n.6, p.331-335, 2013.

KONRAD, J.L. et al. Detection of antibodies against *Brucella abortus*, *Leptospira spp.*, and Apicomplexa Protozoa in Water Buffaloes in the Northeast of Argentina. **Trop. Anim. Heal. and Prod.** v.45, n.8, p. 1751-1756, 2013.

LANGONI, H. et al. Aglutininas anileptospíricas em búfalos do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo. **Ciênc. Rur.** v.29, n.2, p.305-307, 1999.

LEVETT, P.N. Leptospirosis. **Clin. Microbiol. Rev.** v.14, n.2, p.296-326, 2001.

LILENBAUM, W.; RODRIGUES, F.; BARBOZA, F. Aglutininas antileptospiras em caninos do município amazônico de Oriximiná - Pará, Brasil. **Rev. bras. Ci. Vet.** v.7, n.3, p.133-135, 2000.

LIRA, G.M. et al. Composição centesimal, valor calórico, teor de colesterol e perfil de ácidos graxos da carne de búfalo (*Bubalis bubalis*) da cidade de São Luiz do Quitunde-AL. **Rev. Inst. Adolfo Lutz.** v.64, n.1, p.31-38, 2005.

MARIANELLI, C. et al. Molecular detection of *Leptospira* species in aborted fetuses of water buffalo. **Vet. Rec.** v.161, p.310-312, 2007.

MARTINS, G. First isolation of *Leptospira noguchii* serogroups Panama and Autumnalis from cattle. **Epidemiol. Infect.** p.1-4, 2014.

MORAES, B. C. et al. Variação espacial e temporal da precipitação no estado do Pará. **Acta Amaz.** v.35, n.2, p. 207-214, 2005.

NARDI JUNIOR, G. et al. Perfil de Aglutininas Anti-Leptospira em Bezerras Búfalas Vacinadas com Bacterina Pentavalente Comercial contra Leptospirose. **Arq. Bras. de Med. Vet. e Zoot.** v.58, n.3, p.299-304, 2006.

OIE. Organização Mundial de Saúde Animal. Leptospirosis **Terrestrial Manual**. 2014. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.01.09_LEPTO.pdf, acesso em: 01/10/2015. In:_____.

OLIVEIRA, D.S.C.; GUIMARAES, M.J.B; MEDEIROS, Z. Modelo produtivo para a leptospirose. **Rev. de Patol. Trop.** v.38, n.1, p.17-26, 2009.

PETRAKOVSKY, J. et al. Animal leptospirosis in Latin America and the Caribbean countries: Reported outbreaks and literature review (2002-2014). **Int. J of Env. Res. and Pub. Health.**v.11, p.10770-10789, 2014.

RODRIGUES, C.G.; MULLER, E.E.; FREITAS, J.C. Leptospirose bovina: Sorologia na bacia leiteira da região de Londrina, Paraná, Brasil. **Ciênc. Rur.** v.29, n.2, p.309-314, 1999.

RYU, E.; LIU, C.K. Studies on the susceptibility of water buffaloes to leptospira. **Can. J. Camp. Med.**. v.32, p.4447-449, 1968.

SALDANHA, G.B. et al. Sorologia positiva para *Leptospira butembo* em bovinos apresentando problemas reprodutivos. **Ciênc. Rur.** v.37, n.4, p.1182-1184, 2007.

SARMENTO, A.M.C. et al. Emprego de estirpes *Leptospira* spp. isoladas no Brasil na microtécnica de soroaglutinação microscópica aplicada ao diagnóstico da leptospirose em rebanhos bovinos de oito Estados brasileiros. **Pesq. Vet. Bras.** v.32, n.7, p.601-606, 2012.

SOUSA, C.L. et al. Avaliação microbiológica e físico-química de doce de leite e requeijão produzidos com leite de búfala na Ilha do Marajó- PA. **B CEPPA.** v.20, n.2, p. 191-202, 2002.

SWANCHAROEN, D. et al. Serological Survey of Leptospirosis in Livestock in Thailand. **Epidemiol. and Infect.** v.141, n.11, p.2269-2277, 2013.

VASCONCELLOS, S.A. et al. Isolation of *Leptospira santarasai*, serovar Guaricura from buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Vale do Ribeira, São Paulo, Brazil. **Braz. J of Microbiol.** v.32, p.298-300, 2001.

VERRUMA, M.R.; SALGADO, J.M. Análise química do leite de búfala em comparação ao leite de vaca. **Sci. Agric.**. v.51, n.1, p131-137, 1994.

VIANA, K.F.; ZANINI, M.S.; MOREIRA, E.C. Frequencia de anticorpos anti-Leptospira spp. em rebanhos bovinos da bacia leiteira do Caparaó, estado do Espírito Santo. **Arch. of Vet. Sci.** v.15, n.2, p.100-106, 2010.

VIANA, R.B. et al. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum*, *Brucella sp.*, e *Leptospira spp.* em búfalos (*Bubalus bubalis*) criados na Amazônia. **Arq. Inst. Biol.** v.76, n.3, p.453-457, 2009.