

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

**Avaliação da soroprevalência e fatores de risco para leptospirose em rebanhos
bovinos leiteiros de diferentes mesorregiões do Rio Grande do Sul**

Janaína Fadrique da Silva

Pelotas, 2019

Janaína Fadrique da Silva

Avaliação da soroprevalência e fatores de risco para leptospirose em rebanhos bovinos leiteiros de diferentes mesorregiões do Rio Grande do Sul

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Prof. Dr. Odir Antônio Dellagostin
Coorientadora: Dra. Lígia Margareth Cantarelli Pegoraro

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

S586 Silva, Janaína Fadrique da

Avaliação da soroprevalência e fatores de risco para leptospirose em rebanhos bovinos leiteiros de diferentes mesorregiões do Rio Grande do Sul / Janaína Fadrique da Silva ; Odir Antônio Dellagostin, orientador ; Lígia Margareth Cantarelli Pegoraro, coorientadora. — Pelotas, 2019.

63 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Leptospirose bovina. 2. Prevalência. 3. Epidemiologia. 4. Fatores de risco. 5. Djasiman. I. Dellagostin, Odir Antônio, orient. II. Pegoraro, Lígia Margareth Cantarelli, coorient. III. Título.

CDD : 636.089

Janaína Fadrique da Silva

Avaliação da soroprevalência e fatores de risco para leptospirose em rebanhos bovinos leiteiros de diferentes mesorregiões do Rio Grande do Sul

Dissertação aprovada como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências no Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 28/02/2019

Banca examinadora:

Prof. Dr. Odir Antônio Dellagostin (Orientador)
Doutor em Biologia Molecular pela University of Surrey

Prof. Dr. Sérgio Jorge
Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Profa. Dra. Daiane Hartwig
Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Guilherme Nunes de Souza
Doutor em Ciência Animal pela Universidade Federal de Minas Gerais

**Dedico a Deus a realizaçãõ deste trabalho.
Foi com a força Dele que consegui.**

Agradecimentos

Agradeço, acima de tudo, a Deus. Ele que guiou meus passos, me segurou em seus braços, e me deu forças para continuar quando tudo parecia desmoronar. Agradeço pelas pessoas que nesses dois anos cruzaram meu caminho, proporcionando um momento de aprendizado profissional, mas acima de tudo pessoal.

À minha mãe que de uma maneira ou de outra, me apoiou como pode, e me tornou mais forte a cada dia e aos meus filhos: Emily, Pitoka, Piriguete e Leleco por todo o carinho, apoio nos estudos e lambibeijos que recebi quando achei que não ia conseguir.

A todas as cuidadoras que ficaram com a mãe enquanto eu assistia às aulas ou realizava meu experimento, pela compreensão durante os momentos difíceis, pelo carinho, paciência e por estarem ao meu lado me apoiando e incentivando em todos os momentos.

Ao Róber Zardo e a Tatiane Senna Bialves pelos ensinamentos iniciais das análises da Técnica de Aglutinação Microscópica e da cultura das leptospiros.

À Lígia Margareth Cantarelli Pegoraro e amigos da Embrapa, por toda a ajuda, amizade, compreensão, carinho e incentivo, sem vocês eu não estaria aqui.

À Patrícia Carvalho Gindri pela companhia nas aulas, amizade, ajuda na dissertação e nos momentos de desespero.

À Jorga Pradiee pelo empréstimo do Notebook, sem ela esta dissertação demoraria séculos para ser escrita.

Aos meus estagiários e amigos, Diego Alexandre Hemb Alba, Kauane Nayara Bahr Ledebuhr e Gabriela Oliveira da Rocha Brito, por toda a ajuda na realização das análises, perseverança, dedicação ao projeto e confiança depositada, mas acima de tudo pelas conversas, risadas, incentivo e amizade verdadeira. Sem vocês certamente não existiria esta dissertação.

Ao professor Odir Antônio Dellagostin, pela oportunidade que me foi dada, na qual tenho muito orgulho de ter sido sua orientada, e também pela compreensão e apoio nos momentos difíceis.

Ao Professor Fábio Raphael Pascoti Bruhn e a colega Mestranda Bianca Conrad Bohm pela ajuda na estatística e melhor compreensão dos resultados.

À equipe do Laboratório de Vacinologia da UFPel, por terem me acolhido e por todo o auxílio na prática de laboratório, bem como durante uma fase difícil da minha vida, em especial ao Prof. Dr. Sérgio Jorge, sendo um quase terceiro orientador, acompanhando o trabalho desde o início e, a Jéssica Dornelles pela grande amizade e companhia.

Aos colegas da Embrapa Clima Temperado, Embrapa Gado de Leite, Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural (EMATER), Universidade Federal de Pelotas, pela idealização do projeto, mapeamento das propriedades e coleta das amostras e Dr. Rogério Rodrigues do IPVDF Instituto de Pesquisa Desiderio Finamor, por toda ajuda na manutenção e doação das cepas.

À amiga Estela Fernandes e Silva pela ajuda na inscrição corrida, amizade e Cleiva Matos pelo carinho, incentivo e amizade.

Ao namorado Patrick Dias Goebel, que apareceu no momento certo para incentivar o término da dissertação, e que me ensinou que temos que persistir sempre, pois se fosse fácil qualquer um conseguiria.

Ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária pela possibilidade de realizar a pesquisa e a CAPES pela concessão da bolsa e financiamento do experimento.

Enfim, a todos que fizeram parte deste projeto ou que contribuíram de alguma forma para que o objetivo fosse alcançado, muito obrigada.

***“O êxito na vida não se mede pelo caminho que você conquistou,
mas sim pelas dificuldades que superou pelo caminho.”
Abraham Lincoln***

Resumo

Da Silva, Janaína Fadrique. **Avaliação da soroprevalência e fatores de risco para leptospirose em rebanhos bovinos leiteiros de diferentes mesorregiões do Rio Grande do Sul.** 2019.63f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

A leptospirose é uma zoonose distribuída mundialmente e em bovinos esta relacionada com transtornos reprodutivos como abortos, natimortos, retenção de placenta, morte do bezerro nas primeiras 72 horas e repetição de cio, ocasionando perdas significativas importantes. O objetivo do estudo foi avaliar a soroprevalência de anticorpos aglutinantes anti-*Leptospira*, identificar os sorovares/sorogrupos prevalentes e, avaliar os fatores de risco para leptospirose em soros de bovinos leiteiros de diferentes mesorregiões do Rio Grande do Sul. Foram coletadas 442 amostras sanguíneas em junho de 2016, representativas das mesorregiões Noroeste e Nordeste (MR 1), Noroeste (MR 2) e Sudeste e Sudoeste (MR 3) do RS. As amostras foram submetidas à técnica de soroaglutinação microscópica (SAM) contra 13 sorovares de *Leptospira* spp. A prevalência média de anticorpos encontrada foi 77,37% (74,61% na MR 1, 84,04% na MR 2 e 77,36% na MR 3). Os sorovares e os respectivos sorogrupos prevalentes na MR 1 foram *Icterohaemorrhagiae* (30,94%) e *Djasiman* (28,06%), sorogrupos *Icterohaemorrhagiae/Djasiman*, respectivamente. Na MR 2, o sorovar prevalente foi o *Djasiman* (29,73%) seguido pelo sorovar *Hardjo* (*Hardjobovis*) com 12,16% e na MR 3 foram *Djasiman* (58,26%) e *Copenhageni* (6,09%) (sorogrupo *Icterohaemorrhagiae*). Os sorovares prevalentes foram validados molecularmente e os fatores de risco foram avaliados considerando $p \leq 0,05$ como significativo. A ocorrência de problemas reprodutivos como abortos no final da gestação e problemas no parto, como natimortos e más formações, foram significativos para o sorovar *Djasiman*, assim como, a presença de roedores na propriedade e de áreas alagadiças, contato dos animais com essas áreas e controle de roedores. Não foram significativos sinais reprodutivos como: repetição de cio, aborto meio período de gestação, retenção de placenta e terneiros fracos ao nascer, assim como diagnóstico de leptospirose no rebanho e realização de vacinação para esta enfermidade. A alta prevalência do sorovar *Djasiman*, indica a ocorrência de infecção incidental, pois está associada a possível transmissão indireta com urina contaminada, presença de áreas alagadiças e, de roedores no rebanho perpetuando a enfermidade, sendo necessária a realização de medidas de controle e prevenção para minimizar os transtornos reprodutivos causados pela leptospirose em bovinos de leite na área de estudo.

Palavras-Chave: leptospirose bovina; prevalência; epidemiologia; fatores de risco; *djasiman*.

Abstract

SILVA, Janaína Fadrique da. **Seroprevalence assessment and risk factors for leptospirosis in dairy cattle from different regions of Rio Grande do Sul** 2019. 63f. Dissertation (Master degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

Leptospirosis is a worldwide and bovine zoonosis that is used with reproductive disorders such as miscarriages, stillbirths, placental retention, calf death within the first 72 hours and repetition of state, leading to important tests. The aim of the study was to evaluate the seroprevalence of anti-leptospira binders, to identify the prevalent serovars / serogroups and to evaluate the risk factors for leptospirosis in dairy cattle sera from different regions of Rio Grande do Sul. A total of 442 blood samples were collected in June 2016, representing the Northwest and Northeast (MR 1), Northwest (MR 2) and Southeast and Southwest (MR 3) mesoregions of RS. The samples were submitted to the microscopic agglutination technique (SAM) against 13 *Leptospira* spp. The average prevalence of antibodies found was 77.37% (74.61% in MR 1, 84.04% in MR 2 and 77.36% in MR 3). The serovars and their respective prevalent serogroups in MR 1 were Icterohaemorrhagiae (30.94%) and Djasiman (28.06%), Icterohaemorrhagiae / Djasiman serogroups, respectively. In MR 2, the most prevalent serovar was Djasiman (29.73%) followed by Hardjo (Hardjobovis) with 12.16% and in MR 3 Djasiman (58.26%) and Copenhageni (6.09%) (serogroup). Icterohaemorrhagiae). Prevalent serovars were molecularly validated and risk factors were evaluated considering $p \leq 0.05$ as significant. The occurrence of reproductive problems such as miscarriages at the end of pregnancy and problems in childbirth, such as stillbirths and malformations, were significant for Djasiman sorbing, as well as the presence of rodents in the property and wetlands, contact of animals with these areas and rodent control. There were no significant reproductive signs such as estrus repetition, abortion during pregnancy, placental retention and weak calves at birth, as well as diagnosis of leptospirosis in the herd and vaccination for this disease. The high prevalence of Djasiman serovar indicates the occurrence of incidental infection, as it is associated with possible indirect transmission with contaminated urine, presence of swampy areas and of rodents in the herd perpetuating the disease. minimize reproductive disorders caused by leptospirosis in dairy cattle in the study area.

Keywords: bovine leptospirosis; prevalence; epidemiology; risk factors; djasiman.

Lista de Figuras

Figura 1	Microscopia eletrônica de varredura de <i>L. interrogans</i> sorovar Icterohaemorrhagiae.....	20
Figura 2	Leptospiras vistas ao microscópio de campo escuro (200x).....	20
Figura 3	Formas de transmissão da Leptospirose.....	23
Artigo	Seroprevalence and assessment of risk factors for leptospirosis in dairy cattle from Southern Brazil: a cross-sectional study	
Figure 1	Cities with dairy cattle serum samples evaluated in Rio Grande do Sul State, Southern Brazil.....	48
Figure 2	Serogroups prevalence in Mesoregion 1 (A), Mesoregion 2 (B) and Mesoregion 3 (C) from Rio Grande do Sul State.....	49

Lista de Tabelas

Artigo	Seroprevalence and assessment of risk factors for leptospirosis in dairy cattle from Southern Brazil: a cross-sectional study	
Table 1	Population data of cattle and animal herds sampled for the study of leptospirosis prevalence, divided by mesoregions of Rio Grande do SulState.....	43
Table 2	General presentation of the epidemiological questionnaire applied to owners on dairy farms.....	44
Table 3	Results statistical analysis Chi-square independent variable Serovar Djasiman and dependent variables reproductive and delivery problems.....	45
Table 4	Results statistical analysis Chi-square independent variable Serovar Djasiman and risk factors as dependent variables.....	46

Lista de Abreviaturas e Siglas

AI	<i>Artificial Insemination</i> (Inseminação Artificial)
SAM	Soroaglutinação Microscópica
BoHV-1	<i>Bovine alphaherpesvirus 1</i> (Herpesvírus Bovino Tipo 1)
BVDV	<i>Bovine Viral Diarrhea Virus</i> (Diarréia Viral Bovina)
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio Imuno enzimático)
EMATER	Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EMJH	Elinghausen McCullough Johson Harris Modificado
FAPERGS	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul
gDNA	Ácido Desoxirribonucléico genômico
IBR	<i>Infectious Bovine Rhinotracheitis</i> (Rinotraqueíte Infeciosa Bovina)
IC	Intervalo de Confiança
LGA	<i>Late Gestation Abortion</i> (Aborto final de gestação)
LPS	Lipopolissacarídeo
MAT	<i>Microscopic Agglutination Test</i> (Técnica de Aglutinação Microscópica)
MR 1	Mesorregião Noroeste e Nordeste
MR 2	Mesorregião Noroeste
MR 3	Mesorregião Sudeste e Sudoeste
MTA	<i>Mid Trimester Abortion</i> (Aborto meia gestação)
NB	<i>Natural Breeding</i> (Monta Natural)
OR	<i>Odds Ratio</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (tampão fosfato salino)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
pH	Potencial Hidrogeniônico

PI	Persistentemente Infectados
RE	<i>Returns to Estrus</i> (Retorno ao Cio)
RPM	Rotações Por Minuto
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i> (Pacote Estatístico para as Ciências Sociais)
UNIJUI	Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul
VNTR	<i>Variable-Number Tandem-Repeat</i> (Repetições em tandem de número variável)
WCAB	<i>Weak Calves After Birth</i> (Terneiros Fracos ao Nascer)

Lista de Símbolos

\leq	Menor ou igual
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
$\text{\textcircled{R}}$	<i>Registered (Registrado)</i>
μ	Micro

Sumário

1 Introdução.....	15
2 Objetivos.....	18
2.1 Objetivo Geral.....	18
2.2 Objetivos Específicos.....	18
3 Revisão de Literatura.....	19
3.1 Agente etiológico.....	19
3.2 Epidemiologia.....	21
3.3 Formas de transmissão.....	23
3.4 Patogenia e Sinais Clínicos.....	24
3.5 Diagnóstico.....	25
3.6 Diagnóstico Diferencial.....	27
3.7 Prevenção e Controle.....	28
3.8 Tratamento.....	29
4 Artigo.....	30
5 Considerações Finais.....	50
Referências.....	51
Anexos.....	58

1 Introdução

Em 2017, o rebanho bovino no Brasil foi de 214,9 milhões de cabeças, onde cerca de 30% das vacas apresentaram falhas reprodutivas por vários fatores, ocasionando consideráveis perdas econômicas (IBGE, 2017). Estima-se que os agentes infecciosos sejam responsáveis por mais de 30% dos casos de perdas gestacionais em bovinos (LIBONATI et al., 2018) e, entre os agentes destacam-se: herpesvirus bovino tipo-1 (BoHV-1), vírus da diarreia viral bovina (BVDV), *Leptospira* spp. e *Neospora caninum* (ALFIERI, A. A; ALFIERI, A. F. 2017).

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial, e todos os mamíferos são suscetíveis a infecção. Em bovinos, de acordo com o sorovar prevalente, a forma aguda pode cursar com febre, hematúria e hemoglobinúria. Já a forma crônica pode ocasionar transtornos reprodutivos como: ocorrência de abortos, natimortos, fetos mumificados, retenção fetal e placentária, morte do bezerro nas primeiras 72 horas, cios irregulares e até infertilidade. Esta enfermidade em rebanhos leiteiros ocasiona também queda na produção leiteira e, conseqüentemente, perdas econômicas importantes na bovinocultura. A sua transmissão se dá através do contato com urina contaminada contendo leptospiras patogênicas que podem ser excretadas através do leite, reforçando a importância do controle e de sua prevenção nos rebanhos (CORREIA et al., 2017 e TOMICH et al., 2007).

Em animais selvagens e silvestres a infecção também é possível, podendo estes animais servirem de fonte de infecção para os animais domésticos e até mesmo o homem (HARTLEBEN, C. P.; BROD, C. S, 2016).

A Leptospirose é causada por bactérias patogênicas do gênero *leptospira*, distribuídas em mais de 30 espécies onde pelo menos nove são patogênicas, sendo a *Leptospira interrogans* a de maior importância humana e animal. Esta bactéria geralmente não é hospedeiro específica, porém alguns sorovares demonstram afinidade por determinados hospedeiros (PICARDEAU, M., 2017, THIBEAUX, R., et al., 2018).

Sorologicamente, as leptospiras são divididas em mais de 300 sorovares definidos de acordo com a heterogeneidade do lipopolissacarídeo (LPS) de sua

membrana externa (PICARDEAU, M., 2017). Os sorovares mundialmente prevalentes nos rebanhos bovinos são: Hardjobovis, bem como outros do sorogrupo Sejroe, causando infecção crônica e persistente no trato reprodutivo. Os bovinos são considerados os hospedeiros primários de manutenção para este sorovar.

Porém outros sorovares podem ser causadores da leptospirose bovina como Pomona, Icterohaemorrhagiae e Grippotyphosa (FAVERO et al., 2017). Em rebanhos bovinos o sorovar Djasiman é pouco citado na literatura. No experimento realizado por Juliano e colaboradores em rebanho leiteiro (2000) este apresentou baixa prevalência (menor que 10%). Estudos sorológicos realizados na região sul do Brasil em bovinos em 1999, demonstraram que a leptospirose é endêmica e encontra-se amplamente disseminada, com prevalência média de 38,75%, sendo o sorovar Hardjo (Hardjobovis) o mais encontrado (HERRMANN et al., 2012).

A produção brasileira de leite em 2017 foi de 33,5 bilhões de litros, e a região sul é a maior produtora com 35,7% do total de litros produzidos (IBGE, 2017). A atividade leiteira está presente na maioria (93,6%) dos municípios do estado do Rio Grande do Sul, representando assim uma forma significativa de renda (EMATER, 2017). A mesorregião Noroeste é a mais especializada na produção de leite por unidade de área, embora a mesorregião Sudoeste apresente o maior rebanho bovino (WESCHENFELDER et al., 2005). Segundo Jung (2017), em 2012 a mesorregião Noroeste respondia por dois terços da produção estadual de leite e em 2016, foi responsável pela produção de 3.093.412 litros de leite (IBGE, 2016). O clima nas mesorregiões estudadas é subtropical, com invernos relativamente frios e verões quentes, com chuvas bem distribuídas, sendo propícia a sobrevivência de leptospiros patogênicas, que podem ocasionar perdas importantes se transmitidas aos animais e humanos (OLALDE, A. R.; HAAS, J. M, 2017).

Devido a grande variabilidade de sorovares de leptospira spp., estudos locais de prevalência desta enfermidade são necessários para melhor estimar sua ocorrência. No entanto, poucos estudos foram realizados utilizando o sorovar Djasiman no diagnóstico sorológico no Rio Grande do Sul, levando a uma escassez de dados estatísticos sobre o sorovar nesta localidade. O diagnóstico da leptospirose bovina e a identificação do sorovar/sorogrupo prevalente são essenciais para o conhecimento da epidemiologia, prevenção e controle da enfermidade, permitindo a elaboração de vacinas que contenham os sorovares predominantes na região, para assim evitar a disseminação do agente no rebanho e até a transmissão

ao ser humano. De acordo com o contexto, foi realizado um estudo epidemiológico em diferentes mesorregiões do Rio Grande do Sul no qual faz parte esta dissertação, avaliando os sorovares prevalentes e os fatores de risco para a Leptospirose bovina, gerando com a realização deste experimento um artigo científico.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a soroprevalência de anticorpos aglutinantes anti-*leptospira* em soros de rebanhos leiteiros de diferentes mesorregiões do Rio Grande do Sul e os fatores de risco associados à infecção.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar os sorovares/sorogrupos prevalentes nas diferentes mesorregiões estudadas;
- Validar os sorovares prevalentes por meio da técnica molecular de *Variable Tandem Number Repeats* (VNTR);
- Avaliar a relação da prevalência do sorovar Djasiman com os sinais clínicos observados em vacas nas propriedades leiteiras;
- Avaliar os fatores de risco para leptospirose bovina em rebanhos leiteiros de diferentes mesorregiões do Rio Grande do Sul.

3 Revisão de Literatura

3.1 Agente etiológico:

A leptospirose é uma doença de caráter zoonótico causada por bactérias do gênero *Leptospira*, pertencentes à família *Leptospiraceae*, da ordem *Spirochaetales*. Atualmente distribuídas em mais de 30 espécies diferentes, divididas em três subgrupos de acordo com sua patogenicidade. Dentre elas, as espécies patogênicas com capacidade de infectar o homem e os animais são: *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. noguchii*, *L. weilii*, *L. alexanderi*, *L. kmetyi*, *L. alstonii* e *L. mayottensis*. Cinco são capazes de infectar causando sinais mais brandos: *L. inadai*, *L. broomii*, *L. fainei*, *L. wolffii* e *L. licerasiae*. E doze espécies saprófitas, encontradas na água e no ambiente, que são incapazes de causar doença. Dentre elas destacam-se: *L. biflexa*, *L. wolbachii*, *L. meyeri*, *L. vanthielii*, *L. terpstrae*, *L. idonii* e *L. yanagawae* (PICARDEAU, M., 2017, THIBEAUX, R., et al., 2018).

Sorologicamente, as leptospirosas são divididas em mais de 300 sorovares definidos de acordo com a heterogeneidade do lipopolissacarídeo (LPS) de sua membrana externa. Os sorovares relacionados de acordo com a antigenicidade são agrupados em sorogrupos, baseando-se na variabilidade do lipopolissacarídeo através da aglutinação após a adsorção cruzada com antígeno homólogo. As leptospirosas são bactérias finas e longas, flexíveis, móveis e enroladas para o lado direito sobre seu próprio eixo, adquirindo um formato helicoidal ou em espiral (Figura 1). Apresentam de 10 a 20 µm de comprimento e 0,15 µm de diâmetro, com uma ou ambas as extremidades afinadas e curvadas em forma de gancho. Possuem um cilindro protoplasmático que se enrola ao redor de um filamento axial central. Possuem dois filamentos axiais polares, denominados flagelos periplasmáticos, que ampliam sua capacidade de locomoção conferindo-lhes alta motilidade em meio aquoso (PICARDEAU, 2017).

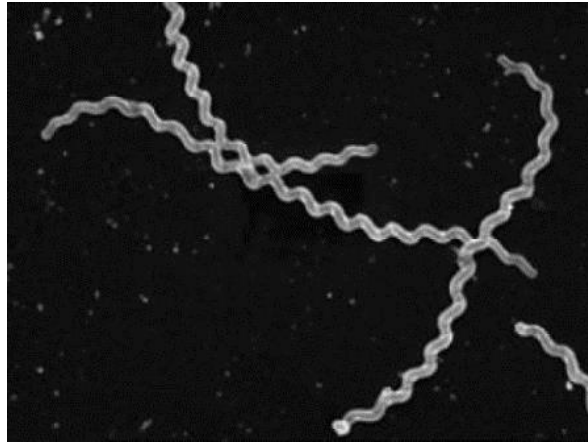


Figura 1 Microscopia eletrônica de varredura de *L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae.
 Fonte: Science daily <https://www.sciencedaily.com/releases/2007/10/071027174533.htm>

São bactérias Gram-negativas apresentando o LPS como o seu principal componente antigênico, porém de baixa endotoxicidade. A visualização das leptospiros é possível através de microscopia de campo escuro (Figura 2) ou imunofluorescência. As leptospiros não se coram pelas colorações habituais, somente impregnando a parede celular com prata pelo método de Fontana-Tribondeau (WHO, 2003).



Figura 2. Leptospiros vistas ao microscópio de campo escuro (200x).
 Fonte: arquivo pessoal.

São aeróbicas estritas e apresentam temperatura ótima de crescimento entre 28 e 30°C e, pH ideal entre 7,2 e 7,4 (CASTRO et al. 2010) O meio líquido de Ellinghausen-McCullough modificado por Johnson e Harris (EMJH) é o mais utilizado para o seu cultivo, e apresenta em sua formulação nutrientes essenciais para o seu desenvolvimento, como ácidos graxos de cadeia longa (Tween 80) sua principal fonte de energia, albumina sérica bovina, ácido oleico, vitaminas B2 e B12, sais de

amônio, ferro, fosfato, cálcio e magnésio (SIMÕES et al., 2016 e ELLINGHAUSEN; MCCULLOUGH, 1965).

São destruídas pela desidratação, pela ação de desinfetantes ou em meio ácido por causarem desorganização da estrutura da membrana externa (CASTRO et al. 2010). Seu crescimento é inibido em pH abaixo de 6,8 e superior a 8. Em condições favoráveis ao seu desenvolvimento podem sobreviver por longos períodos, sendo frequentemente encontradas na lama, acúmulos de água doce e em órgãos e tecidos de animais vivos ou mortos (MOHAMMED et al., 2011).

A presença de áreas alagadiças em regiões tropicais e subtropicais, favorece a ocorrência da enfermidade, devido a persistência e multiplicação das bactérias em ambientes alagados, podendo sobreviver por até 180 dias, dependendo das condições de temperatura, pH, salinidade e poluição, (ROLIM, 2012 e MINEIRO et al. 2007).

3.2 Epidemiologia

A epidemiologia e as características clínicas da leptospirose estão geralmente associadas aos sorovares e sorogrupos de *Leptospira* ssp. Estima-se que a leptospirose seja a zoonose mais comumente diagnosticada, o que resulta em alta morbidade e considerável mortalidade em áreas de alta prevalência (NAGALINGAM et al., 2015). Em 2017, supõe-se que existam cerca de 1 milhão de casos graves de leptospirose em humanos com 60. 000 mortes por ano (PICARDEAU, 2017). A taxa de morbidade para a doença clínica é alta, podendo atingir 100% dos animais suscetíveis, porém a taxa de letalidade é baixa sendo em torno de 5% (SIMÕES et al., 2016).

A prevalência desta enfermidade depende de animais portadores infectados e assintomáticos, número de animais do rebanho, condições sanitárias e de sobrevivência das leptospirosas no ambiente, como umidade, temperatura elevada e período de chuvas, pH levemente alcalino e do contato do agente com indivíduos suscetíveis, perpetuando a contaminação do ambiente (LANGONI, et al., 2013). A ocorrência da doença é elevada em regiões de clima tropical e subtropical. O período chuvoso impede a evaporação da urina contendo *Leptospira* expelida de

animais infectados, permitindo o aumento da incidência da doença (CASTRO et al., 2010).

Os diferentes sorovares de *L. interrogans sensu strictu* não apresentam especificidade de hospedeiro, porém, é observada a preferência de certos sorovares por determinados vertebrados. Além disso, existe a variação dos sorovares presentes em cada região, e das diferentes relações estabelecidas entre eles e a espécie hospedeira, com diferentes níveis de patogenicidade e infectividade (WHO, 2003).

O rato de esgoto (*Rattus norvegicus*) é reservatório do sorovar Icterohaemorrhagiae, tendo como hospedeiro susceptível o homem. O cão doméstico é reservatório do sorovar Canicola e Icterohaemorrhagiae, o suíno do sorovar Pomona, os equinos do sorovar Bratislava, os ovinos dos sorovares Icterohaemorrhagiae, Hebdomadis e Hardjo. Os caprinos são os reservatórios dos sorovares Icterohaemorrhagiae, Castellonis e Grippytyphosa e os bovinos, dos sorovares Hardjo, Wolffi e Pomona, no entanto, podem ser hospedeiros incidentais de uma série de sorovares comuns a outras espécies animais (OLIVEIRA et al., 2013, HASHIMOTO et al., 2010 e WHO, 2003).

Os sorovares relacionados aos animais silvestres são: Patoc, Shermani, Hebdomadis, Autumnalis, Pyrogenes, Australis, Castellonis, Sentot e Andamana. Em cutias (*Dasyprocta spp.*), o sorovar predominante é a Castellonis. Em capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*), Bratislava, Hardjo, Pomona e Grippytyphosa são as mais verificadas e entre os marsupiais, os gambás (*Didelphis albiventris*, *Didelphis aurita*, *Didelphis marsupialis*) são reservatórios de Ballum, Bataviae, Icterohaemorrhagiae, Szwajizam e Grippytyphosa (OLIVEIRA et al., 2013).

O sorovar Djasiman tem como hospedeiros os roedores selvagens. Existem poucos relatos sobre este sorovar na literatura (MORAIS, 2017). Em estudos realizados a sua prevalência encontrada é abaixo de 10%, como no estudo realizado por Juliano et al. em rebanhos leiteiros (2000), onde apresentou prevalência de 2,30% de 426 soros analisados. Um estudo avaliando a prevalência em humanos, na cidade de Joinville (SC), revelou em casos confirmados com a sorotipagem, o sorovar mais frequente Icterohaemorrhagiae (67,6%) seguido do Djasiman com 26,5% dos casos (ARAÚJO, 2000).

3.3 Formas de Transmissão:

A entrada das leptospiros no organismo ocorre através das mucosas, principalmente nasal, ocular e genital, pele escarificada e inclusive pele integra, em condições que propiciam a dilatação dos poros. A transmissão ocorre através de animais infectados ou portadores que através da urina, contaminam o solo, os alimentos e a água, como também ocorre a transmissão pode ocorrer através de fetos abortados e secreções uterinas, sendo sua ocorrência favorecida pelas condições ambientais. A urina é a principal fonte de contaminação, pois uma vez colonizado os rins, os animais portadores podem eliminar as leptospiros na urina por longos períodos (PICARDEAU, 2017 e WHO, 2003). As formas de transmissão estão representadas na figura 3.

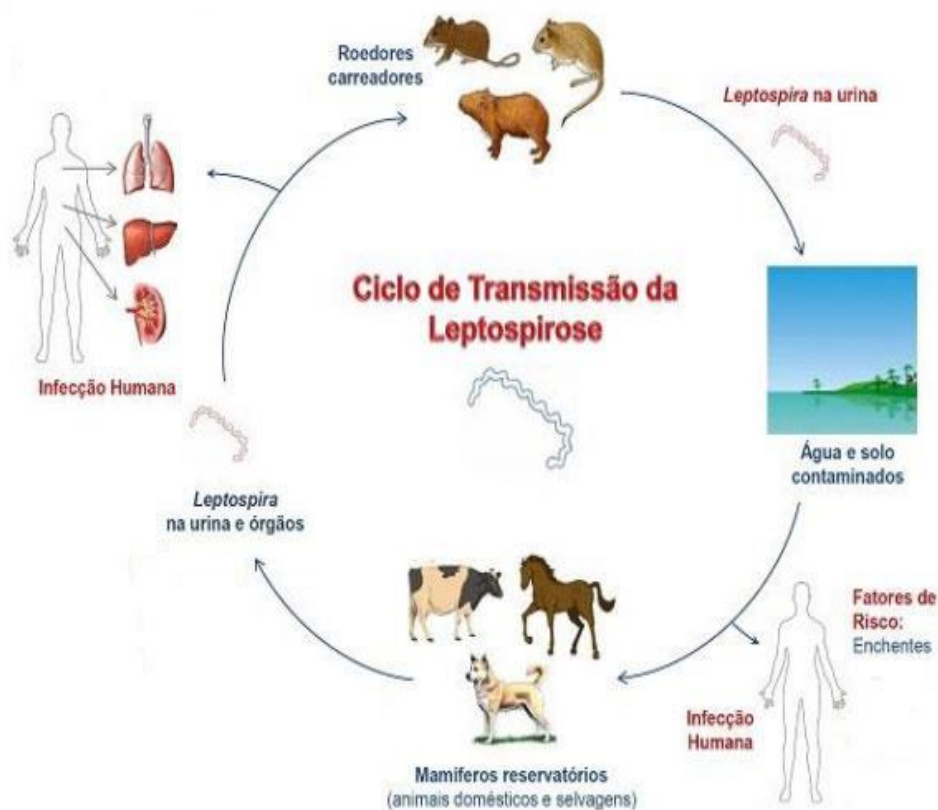


Figura 3: Formas de transmissão da Leptospirose.
Fonte: <https://www.labnetwork.com.br/noticias/guia-rapido-de-leptospirose/>

Tanto animais domésticos como silvestres podem tornar-se portadores e contribuir para a disseminação da bactéria no ambiente. A manutenção da enfermidade nas regiões urbanas e rurais do Brasil é favorecida além do clima, por condições sócio-econômico-culturais. O excesso de lixo acumulado sobre vias e áreas desprotegidas, expostas frequentemente a enchentes e ausência de saneamento básico, propiciam a proliferação de roedores sinantrópicos, favorecendo a persistência e disseminação da bactéria (PICARDEAU, 2017 e OLIVEIRA et al., 2013).

O rato de esgoto, *Rattus norvegicus* e o rato de telhado, *Rattus rattus*, são os mais importantes reservatórios naturais de leptospiras, porém o cão apresenta grande importância na epidemiologia da enfermidade, devido a sua relação próxima com o homem. Os reservatórios podem eliminar leptospiras na urina durante vários meses, mesmo sem apresentar nenhum sinal clínico. Humanos que trabalham em áreas sem saneamento, contaminadas com urina de roedores e cães domésticos, apresentam alto risco de contrair a leptospirose (CASTRO et al., 2010).

A colonização dos túbulos renais e a consequente eliminação da bactéria pela urina é a principal responsável pela contaminação do ambiente e fonte de infecção para outros animais e humanos (PINTO et al., 2016). De acordo com o sorovar causador da infecção podemos ter duas formas da doença: uma quando o animal é infectado por um sorovar hospedeiro adaptado, tornando-se reservatório e a outra quando animais suscetíveis são expostos a sorovares hospedeiros não adaptados causando a infecção incidental, sendo a forma mais comum nos humanos (WHO, 2003).

3.4 Patogenia e Sinais Clínicos

Após a entrada das leptospiras no organismo, estas se multiplicam rapidamente no sistema vascular, disseminando-se, caracterizando um quadro agudo septicêmico denominado de leptospiremia. Componentes das leptospiras podem induzir diretamente lesão tecidual, no entanto, a persistência da infecção gera respostas inflamatórias do hospedeiro, como liberação de citocinas e mediadores inflamatórios, promovendo lesões severas aos órgãos afetados e manifestações clínicas mais graves (SIMÕES et al., 2016).

As lesões iniciais ocorrem da ação mecânica do microrganismo no endotélio de pequenos vasos. Ocorre derrame sanguíneo para os tecidos, levando a formação de trombos, bloqueando assim a passagem sanguínea ocasionando isquemia, resultando em necrose tubular renal, lesão hepatocelular e pulmonar, meningite, miosite e placentite. Em casos mais graves hemorragias e icterícia, com granulocitose e esplenomegalia. Tem colestase ocasionada pela presença de leptospiros nos canalículos biliares, provocando um aumento na bilirrubina sérica. Nos túbulos renais e na bexiga a bactéria não é neutralizada por anticorpos, provavelmente pelo baixo aporte sanguíneo (SIMÕES et al., 2016, TOMICH et al., 2007 e WHO, 2003).

Os sinais clínicos variam dependendo da competência imunológica do hospedeiro, do sorovar causador da infecção e localização do patógeno no organismo. A maioria das infecções é assintomática, sendo os sinais reprodutivos a principal característica da infecção. Na fase aguda da doença, as principais manifestações clínicas são febre, anemia hemolítica com hemoglobinúria, icterícia e petéquias nas mucosas, queda na produção do leite e mastite (SIMÕES et al., 2016 e OLIVEIRA et al., 2013). Na forma crônica ocorrem os sinais reprodutivos como: infertilidade, aborto, natimortos, além de gerar perdas econômicas relacionadas a custos com assistência veterinária e diagnóstico. As formas mais graves ocorrem com mais frequência em bezerros cursando com febre alta, anemia hemolítica, hemoglobinúria, icterícia, congestão e angústia pulmonar, insuficiência renal e hepática (SIMÕES et al. 2016).

3.5 Diagnóstico

O diagnóstico da leptospirose baseia-se no histórico clínico do paciente, contexto epidemiológico, exame físico geral e específico, histórico de vacinação e exames laboratoriais complementares para a sua confirmação.

As provas laboratoriais envolvem testes que se dividem entre a possibilidade de detecção de anticorpos anti-*Leptospira* e da constatação da presença de antígenos ou DNA bacteriano nos tecidos animais. A escolha de cada um dependerá da fase evolutiva em que se encontra o paciente e da finalidade do teste realizado.

A fase de bacteremia transitória ocorre na primeira semana de infecção, onde na maioria das vezes, não apresenta sinais clínicos, o que torna difícil o diagnóstico

inicial. A presença de leptospiras no trato genital ou urinário, pode indicar apenas que o animal seja portador. Na fase de bacteremia se preconiza os testes de detecção de antígeno, visto que ainda não se podem identificar anticorpos no sangue, pois estes aparecem aproximadamente uma semana após o início da doença (WHO, 2003).

Os testes sorológicos baseados na detecção de anticorpos são os procedimentos de escolha para o diagnóstico laboratorial. A técnica de aglutinação microscópica (Microscopic Agglutination Test - MAT) é o teste padrão para o diagnóstico de leptospirose tanto para indivíduos como rebanhos, indicado pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2003).

O princípio do MAT baseia-se na reação de aglutinação entre os anticorpos presentes no soro dos pacientes e do antígeno O do LPS de sorovares de *Leptospiras* spp. vivas. Apresenta como vantagem a diferenciação do sorovar presente na infecção, porém é necessário para o teste os sorovares comuns na região e aqueles característicos da espécie em teste. Tem como desvantagens a utilização de bactérias vivas potencialmente patogênicas na análise, é laborioso, necessita de técnico especializado na realização da leitura e na interpretação dos resultados os indivíduos que apresentam título positivo, podem apresentar reação cruzada a uma variedade de sorovares, dificultando a identificação do sorovar infectante e animais cronicamente infectados podem apresentar títulos de anticorpos a níveis indetectáveis, dificultando a identificação, além de ser impossível diferenciar os tipos e a origem das imunoglobulinas de uma infecção natural de uma vacinação (NAGALINGAM et al., 2015, OIE, 2014 e SOUZA et al., 2012).

Amostras de soro de bovinos que apresentarem títulos de anticorpos maiores que 800 no MAT no momento do aborto, são evidências de leptospirose causada por um sorovar incidental. Testes de diagnóstico desenvolvidos para a identificação da bactéria em tecidos, sangue, urina ou sêmen são indicados para indivíduos crônicos, e para confirmar a presença de *Leptospira* nos tecidos. Outros testes podem ser utilizados de maneira complementar como triagem em grandes populações no diagnóstico da leptospirose, como o ensaio imunoenzimático (ELISA-IgM) que podem utilizar antígenos extratos bacterianos, proteínas bacterianas purificadas ou antígenos recombinantes, reação em cadeia da polimerase (PCR),

imunofluorescência, imunohistoquímica e cultura de sangue, urina ou tecidos com isolamento da bactéria (HARTLEBEN, C. P.; BROD, C. S, 2016).

Variable Number Tandem Repeats (VNTR)

O gênero *Leptospira* consiste em um grupo heterogêneo de espécies, sendo atualmente classificadas em doze espécies patogênicas com base na relação de DNA. *Leptospira interrogans sensu stricto* é a principal espécie associada à leptospirose humana e animal. Sessenta sorovares são validamente descritos, sendo a identificação de um sorovar de extrema importância para a epidemiologia da doença, controle e prevenção. Os sorovares antigenicamente relacionados são agrupados em sorogrupos, no entanto, um determinado sorogrupo é frequentemente encontrado em várias espécies de *Leptospira*. Análise de repetições tandem de número variável (VNTR), também chamado de análise VNTR de múltiplos locos, provou ser um método altamente poderoso e discriminante para caracterizar a população bacteriana através da reação em cadeia da polimerase (MAJED et al., 2005).

3.6 Diagnóstico Diferencial em Bovinos

Para a obtenção do diagnóstico definitivo devem-se diferenciar os dados epidemiológicos, sinais clínicos e exames laboratoriais de doenças que cursam com sintomatologia reprodutiva em bovinos. Os sinais clínicos observados são: declínio na produção de leite e carne, culminando com perdas econômicas significativas e sintomas específicos do trato reprodutivo como: abortos, natimortos, morte do bezerro nas primeiras 72 horas, retenção de placenta e infertilidade. Entre as principais zoonoses que cursam com essa sintomatologia podemos citar:

Brucelose bovina: Doença infecciosa causada por bactérias do gênero *Brucella*. Os bovinos são suscetíveis à *B. suis*, *B. melitensis*, porém a espécie prevalente nos bovinos é a *B. abortus*. A mucosa orofaríngea é considerada a principal fonte de transmissão para os bovinos. A bactéria coloniza tecidos com maior metabolismo como acontece no útero gravídico devido à presença do álcool

poli-hídrico (eritritol). A concentração deste metabólito aumenta a partir do quinto mês de gestação, resultando na multiplicação da bactéria e por consequência o aborto. A eliminação das brucelas no leite pode ocorrer por meses após o aborto (HARTLEBEN, C. P.; BROD, C. S, 2016).

Diarréia Viral Bovina (BVDV): O vírus causador desta enfermidade está associado a problemas reprodutivos, entéricos e respiratórios. A eliminação do vírus ocorre pelas secreções e excreções de animais persistentemente infectados (PI). A transmissão pode ser transplacentária, ocorrendo infecção pelo biótipo não-citopatogênico, durante o primeiro trimestre de gestação, podendo gerar animais PI e imunotolerantes (VIU OLIVEIRA, M. A. et al., 2014^a).

Neosporose: É uma das maiores causas de aborto e mortalidade neonatal em bovinos no mundo. Pode ocorrer também o nascimento de animais assintomáticos portadores, responsáveis pela manutenção da infecção no rebanho. É causada pelo protozoário intracelular obrigatório *Neospora caninum*, que pode infectar vários hospedeiros, silvestres e domésticos, sendo os bovinos os mais sensíveis (HARTLEBEN, C. P.; BROD, C. S, 2016).

IBR (BoHV-1): A Rinotraqueíte Infecciosa bovina é provocada pelo herpes-vírus, que provoca impacto econômico negativo sobre o sistema de produção devido ao retardo do crescimento de animais jovens, da redução da produção leiteira, da mortalidade embrionária e do abortamento, com maior frequência no segundo ou terceiro trimestres de gestação (VIU OLIVEIRA, M. A. et al., 2014^b).

3.7 Prevenção e Controle

A vacinação e controle dos fatores de risco são de extrema importância como medidas preventivas, de forma a reduzir a prevalência de leptospirose. As vacinas para bovinos contra esta enfermidade são preparadas com leptospiros inativas, associadas com adjuvantes, conferindo proteção imunitária contra a infecção causada por sorovares presentes na vacina. A vacinação é anual e aplicada a todo rebanho em áreas de baixa prevalência da doença e, a cada seis meses em regiões

de alta prevalência (HARTLEBEN, C. P.; BROD, C. S., 2016). A implementação de medidas de controle tais como ações de saneamento básico, melhorias nas condições higiênico-sanitárias da população, controle de roedores nas propriedades e educação ambiental são fundamentais para diminuir o potencial zoonótico desta enfermidade (CASTRO et al., 2010). Devido ao potencial de patogenicidade das leptospirosas e da necessidade de cultivo de sorovares em larga escala, abrangendo a região testada, novas abordagens vacinais têm sido estudadas para garantir maior proteção aos animais.

3.8 Tratamento

O tratamento preconizado para a leptospirose é baseado no uso de antibióticos e tratamento suporte para os sinais clínicos apresentados. Podem ser utilizados antibióticos como tetraciclina, oxitetraciclina, doxiciclina, para uso na fase de bacteremia e eliminação do estado portador, ou penicilina e seus derivados no controle apenas da fase de bacteremia. (CASTRO et al., 2010) A oxitetraciclina demonstrou ser capaz de eliminar leptospirosas dos túbulos renais em bovinos infectados pelo sorovar Hardjo (HARTLEBEN, C. P.; BROD, C. S., 2016).

4 Artigo

Seroprevalence and assessment of risk factors for leptospirosis in dairy cattle from Southern Brazil: a cross-sectional study

Janaína Fadrique da Silva, Diego Alexandre Hemb Alba, Sergio Jorge, Patrícia Gindri, Tatiane Senna Bialves, Guilherme Nunes de Souza, Fabio Raphael Pascoti Bruhn, Ligia Margareth Cantarelli Pegoraro, Odir Antônio Dellagostin.

Submetido à revista Tropical Animal Health and Production

1 **Seroprevalence and assessment of risk factors for leptospirosis in dairy cattle from**
2 **Southern Brazil: a cross-sectional study**

3
4
5 Janaína Fadrique da Silva¹, Diego Alexandre Hemb Alba¹, Sergio Jorge¹, Patrícia Gindri⁵,
6 Tatiane Senna Bialves¹, Guilherme Nunes de Souza³, Fabio Raphael Pascoti Bruhn⁴, Ligia
7 Margareth Cantarelli Pegoraro⁵, Odir Antônio Dellagostin¹

8
9
10 ¹Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas,
11 Pelotas, RS, Brazil

12 ²Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal
13 de Pelotas, RS, Brazil

14 ³Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Gado de Leite,
15 Juiz de Fora, MG, Brazil

16 ⁴Departamento de Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de
17 Pelotas

18 ⁵Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Clima Temperado,
19 Capão do Leão /RS, Brazil

20
21 ***Corresponding author:** Sérgio Jorge, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia,
22 Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Campus
23 Universitário, Caixa Postal 354, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brazil. Tel. +55 53 32757587;
24 e-mail: sergiojorgevet@hotmail.com

25

26 **Abstract**

27 Cattle are relatively susceptible to leptospirosis chronic infection resulting in production
28 losses including reduced milk yield, reproductive failure and reproductive disorders. This
29 study investigated the leptospirosis seroprevalence and risk factors in dairy herds in different
30 mesoregions of Rio Grande do Sul State, Brazil. An epidemiological interview was applied
31 and sera samples from representative bovine population were collected and tested for
32 leptospirosis. Chi-square was performed to estimate the association of seroreactivity with risk
33 factors. The serovars and the respective serogroups were different in each mesoregion
34 evaluated and the prevalent were Icterohaemorrhagiae (Icterohaemorrhagiae), Djasiman
35 (Djasiman) and serovar Hardjo (Hardjobovis). Reproductive disorders were associated to
36 specific antibodies against Djasiman serogroup and vaccination against leptospirosis was not
37 an important protection factor against that disorder. In conclusion, Djasiman serogroup should
38 be included in commercial bacterins vaccines and control measures should be improved to
39 mitigate reproductive disorders caused by leptospirosis in dairy cattle in the study area.

40

41 **Keywords:** bovine leptospirosis; dairy herds; reproductive disorders; Djasiman serogroup

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51 **Introduction**

52 Leptospirosis is a worldwide zoonosis and in cattle is particularly common in tropical and
53 subtropical regions (Martins and Lilenbaum, 2014). In fact, the majority of the most bovines
54 present a chronic, silent form of the disease, which is characterized by reproductive disorders
55 such as abortion, stillbirths, mummified fetuses, fetal and placental retention, death of calves
56 within 72 hours, infertility and decreased milk production (Heinemann et al., 2000;
57 Lilenbaum and Souza, 2003; Ramos et al., 2006).

58 Serologically, leptospire are divided into more than 300 serovars defined according to the
59 outer membrane lipopolysaccharide (LPS) heterogeneity (Levett, 2001). The most prevalent
60 serovars in cattle herds worldwide are Hardjo, whose main maintenance host is bovine, and
61 serovar Pomona (Otaka et al., 2012; Loureiro et al., 2016; Correia et al., 2017). It has been
62 estimated that about 30% of the cows present reproductive failure by different causes in
63 Brazilian livestock (Baruselli et al., 2012). Bovine leptospirosis is widespread in Rio Grande
64 do Sul State, south of Brazil, with a prevalence of 38.75%, and the most diagnosed serovar
65 Hardjo (Hardjobovis, strain) (Herrmann et al., 2012).

66 Risk factors such as tropical and subtropical climate, regions with high temperatures, well-
67 distributed rainfall, presence of rodents and wetlands help the survival of the disease
68 (Lilenbaum and Souza, 2003; Martins and Lilenbaum, 2013). The diagnosis of bovine
69 leptospirosis in a specific area, and the identification of the prevalent serovar/serogroup are
70 essential for the epidemiology, prevention and prophylaxis of the disease (Otaka et al., 2012) .

71 Milk is produced commercially in 93.6% of the municipalities of the State, making milk
72 production a significant form of income (Emater, 2017). The aims of this study were to
73 evaluate the prevalence of specific antibodies against leptospire, to identify the prevalent
74 serovars, and the risk factors in dairy herds from different mesoregions of Rio Grande do Sul
75 State, Southern Brazil.

76 **Materials and methods**

77 **Study area** Simple random sampling was used for a selection of herds and animals in four
78 mesoregions of Rio Grande do Sul state (Southeast, Southwest, Northeast and Northwest
79 mesoregions). The target population or sample was composed of milking cows herds
80 belonging to local milk cooperatives and an association of producers.

81 **Samples** Representative sampling method was performed and determined by EpiTools®
82 software. The parameters used for sampling were 50% expected prevalence among
83 individuals for leptospirosis, 10% sampling error and 95% significance level. To put it briefly,
84 a total of 442 blood samples from lactating cows were collected in June 2016 (Table 1): 193
85 samples were collected from the Northeast and Northwest mesoregions (MR1), covering 26
86 municipalities in the Northwest region, 22 in the Northeast region, and one in the
87 metropolitan area of Porto Alegre; 94 samples (MR2) were collected in 18 herds of 17
88 municipalities in the Northwest region; 155 samples and in the Southeast (22 herds) and
89 Southwest (one herd only) mesoregions (MR3). Vaccinated with commercial bacterins
90 (n=219) and unvaccinated animals (n=223) were considered in this study. The areas where the
91 samples were collected are shown in Figure 1 and the cities in Supplementary Material 1.

92 **Epidemiological interview** The methodology of this study consisted of collecting animal
93 serum samples and information about the characteristics and sanitary conditions of each farm
94 through an epidemiological interview (Table 2).

95 **Serology** Blood samples were centrifuged at 3.500 rpm for 10 minutes to separate the serum
96 and then were stored at -20 °C. Laboratory analyses were performed at the Laboratório de
97 Vacinologia, Universidade Federal de Pelotas. For the screening reactive animals, the serum
98 samples were submitted to the microscopic agglutination test (MAT) as previously described
99 (Budihal and Perwez, 2014). In essence, each serum was diluted 1:50 in PBS buffer for
100 screening and titration. For the test, 13 serovars were selected as shown in table 2. The strains

101 were maintained in modified Ellinghausen, McCullough, Johnson and Harris (EMJH) liquid
102 culture media supplemented with 10% albumin, with weekly peaks and incubated at 30 °C.
103 The MAT analyses were performed on 96-well concave bottom plates. The plates were
104 cultivated for 2 hours in a bacteriological incubator at 30 °C. Readings were carried out using
105 a dark field microscope with dry condenser and a blade aid in the 20× objective, verifying the
106 presence or absence of agglutination. The sera were diluted in 1:100 in the screening. They
107 were considered positive when they presented agglutination equal to or greater than 50%
108 compared to the control sample. Reagent samples were serial diluted from 1:100 to 1:3200 to
109 determine the final titre of binding antibodies. The serovar with higher titre in the MAT was
110 considered a prevalent serovar.

111 **Variable-Number Tandem-Repeats (VNTR) of panel serovars**

112 For DNA extraction, a 7-day culture was harvested by centrifugation (15,000 × g for 30 min)
113 at 4 °C and the pellet was frozen at −20 °C. Genomic DNA was extracted using the illustra
114 bacteria genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare®) following the protocol designed for
115 Gram-negative bacteria. The extracted DNA was submitted to agarose gel electrophoresis in
116 order to be quantified and evaluated with regard to its integrity and then stored at −20 °C. For
117 confirming the identify *Leptospira* serogroup and serovar used in MAT, seven discriminatory
118 primers were used: VNTR4, VNTR7, VNTR9, VNTR10, VNTR11, VNTR19 and VNTR23
119 (Majed et al., 2005). The PCR reaction was carried out using a cycle of 94 °C for 5 min,
120 followed by 35 cycles of amplification at 94 °C for 30 min, 55 °C for 30 s, 72 °C for 1 min
121 and a final extension of 72 °C for 30 s. Aliquots were evaluated by agarose gel
122 electrophoresis and the sizes of amplified products were estimated by comparison. DNA from
123 previously characterized *Leptospira interrogans* strain Fiocruz L1-130 was chosen as positive
124 control sample (Nascimento et al., 2004).

125 **Statistical analysis** Statistical analysis to verify the association of clinical signs and risk
126 factors was performed using Pearson's chi-square univariate analysis with the SPSS® version
127 20.0 software, considering $P \leq 0.05$ as significant. Analysis was conducted at herd level. The
128 chi-square test was used to evaluate the association between positivity for the most prevalent
129 serovar/serogroup and reproductive problems. We calculated the strength of association (or
130 risk) by odds ratio (OR) and its 95% confidence interval.

131 **Results**

132 Serology out of the 442 studied lactating cows, the average of specific antibodies against
133 leptospire was 342/442 (77.37%). The prevalence by mesoregion showed 144/193 (74.61%)
134 seroreactive in MR1, 79/94 (84.04%) in MR2, and 120/155 (77.42%) in MR3, and 77.36%
135 was the average. In MR1, the prevalent serovars were *Icterohaemorrhagiae* (serogroup
136 *Icterohaemorrhagiae*) and *Djasiman* (serogroup *Djasiman*) with 30.94% and 28.06%
137 prevalence, respectively. The other serovars/serogroups evaluated showed prevalence lower
138 than 10% (Figure 2A). The ranging were 400 and 800 for *Icterohaemorrhagiae* and 1600 to
139 3200 for *Djasiman* serogroups. In MR2, the prevalent serovars were *Djasiman* (29.73%) and
140 *Hardjobovis* (serogroup *Serjoe*) (12.16%) (Figure 2B). In MR3, serovars *Djasiman* (serogroup
141 *Djasiman*) and *Copenhageni* (serogroup *Icterohaemorrhagiae*) were the most prevalent with
142 58.26% and 6.09% prevalence, respectively (Figure 2C). The serovars/serogroups identify
143 were confirmed by VNTR analysis (data not shown).

144 **Serogroup *Djasiman* prevalence vs reproductive problems** Chi-square statistical analysis
145 showed that reagent sera against serogroup *Djasiman* is present in 86% ($P = 0.035$) of the
146 reproductive problems mentioned, being 41.7% occurrence of miscarriages at the end of
147 pregnancy ($P = 0.017$). The presence of birth problems ($P = 0.005$) as stillbirths ($P = 0.017$)
148 and malformations ($P = 0.011$) was statistically significant, as shown in the Table 3.

149 **Risk factors** In the analysis of risk factors (Table 4), the diagnosis of leptospirosis in the herd
150 was not significant in the study ($P = 0.085$), as well as vaccination ($P = 0.072$). The presence
151 of wetlands, as well as the access of animals to them were significant ($P = 0,012$ and $P =$
152 $0,019$ respectively). The presence of rodents in the property ($P = 0,004$) and the
153 accomplishment of its control ($P = 0,025$) were statistically significant.

154 **Discussion**

155 The high prevalence of specific antibodies in the mesoregions studied was higher than
156 expected (50%), indicating the exposure of the animals to the leptospire evaluated and/or
157 vaccine-induced seroconversion. Interestingly, the seroreactivity against serovar
158 Djasiman/serogroup Djasiman was the most prevalent suggesting a presence of a reservoir,
159 since that currently Djasiman serogroup no is included in formulations of commercial
160 vaccines against bovine leptospirosis. A variable-number tandem repeat (VNTR) analysis for
161 molecular typing of *L. interrogans* sensu stricto and confirmed the antigens identify used on
162 MAT. Current studies suggest that wild rodents as carriers of this serovar in study area
163 (Fornazari et al., 2018), moreover, there is still a lack of information due to a large number of
164 wild animal species that can act as reservoirs in Southern Brazil (Jorge, Hartleben, et al.,
165 2012; Jorge, Monte, et al., 2012; Monte et al., 2013).

166 In this work, the seroprevalence in MR1 was 30.94% on samples reactive for
167 Icterohaemorrhagiae serogroup and 28.6% for Djasiman serogroup. Similar results were also
168 found in the region in MR2 that showed prevalence of 29.73% for Djasiman serogroup and
169 MR3, serogroup Djasiman was the most prevalent of 58.26%. In contrast to our findings,
170 Hardjobovis strain have been identified the most prevalent in cattle from the Southeast and
171 Southwest mesoregions, representing 29.12% of positive reactions and Djasiman serogroup
172 was only 2.30% (Herrmann et al., 2012). Most studies performed in worldwilde showed the
173 Hardjo serovar to be the largest cause of abortions in cattle (Ellis, 2015; Otaka et al., 2012).

174 This study was the first report to prevalence of Djasiman serogroup in dairy cattle offer new
175 insights of leptospirosis epidemiology.

176 The association of reproductive problems with Djasiman serogroup was consistent with the
177 symptoms of chronic leptospirosis infection manifested in the dairy herds. The percentage of
178 reproductive problems not associated with Djasiman serogroup seroreactivity was due to
179 specific antibodies against other serogroups. Reproductive losses such as miscarriages,
180 increased interval between births, and especially repetition of estrus by leptospire are usually
181 associated with serogroup Sejroe (serovar Hardjo) (Lilenbaum and Souza, 2003; Herrmann
182 et al., 2012; Chadsuthi et al., 2017). Abortions caused by leptospirosis infection are usually in
183 outbreaks and can occur at any time during pregnancy, but abortions caused by incidental
184 infection, would occur from the sixth month of pregnancy on the final third (Saldanha et al.,
185 2007; Ellis, 2015). In this work, the presence of birth problems, stillbirths and malformations
186 was statistically significant with Djasiman serogroup. The observation of calving problems in
187 the herd, stillbirths and malformations as observed, are common in this type of infection, as
188 they are one of the main causes of reproductive failure in cattle.

189 The presences of wetlands, as well as the access of animals to them were statistically
190 significant. These results corroborate with previously works that report that the presence of
191 synantropic rodents and wetlands favors the occurrence of the disease and it are an important
192 risk factors. Infection in cattle by adapted serovars, such as Hardjo, is independent of region
193 or precipitation, whereas incidental infections are dependent on environmental factors and
194 more important in tropical and subtropical climate countries (Levett, 2001; Martins and
195 Lilenbaum, 2013).

196 Vaccination was not significant in this study because bacterins vaccine do not contain
197 representative serovars from Djasiman serogroup in commercial formulations. The current
198 cattle vaccines contain only the most commonly prevalent worldwide serovars such as Hardjo,

199 Pomona, Icterohaemorrhagiae, Canicola, Grippothyphosa. Therefore, further studies are
200 needed to produce new vaccines that include a greater variety of serovars, especially those
201 prevalent in the region.

202 From the obtained results it is concluded that this work is innovative in the bovine *Leptospira*
203 epidemiology. This paper showed the uncommon prevalence of the Djasiman serogroup in the
204 study area that is considered not adapted to the bovine, and it suggests an incidental infection.
205 The serovars/serogroups prevalent ranged in each mesoregion studied, reinforcing the need to
206 develop and adopt control and prevention measures. This emphasizes the importance of new
207 epidemiological studies to investigate the risk factors and the landscape of the leptospirosis.
208 New vaccines should be developed with the addition of the Djasiman serogroup to ensure an
209 efficient protection to the herd, reducing reproductive disorders.

210 **Acknowledgments** This study was financed in part by the EMBRAPA (project number
211 02.13.06.016.00.00), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil
212 (CAPES) – Finance Code 001, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
213 Tecnológico (CNPq), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul
214 (FAPERGS), Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural (EMATER-RS), Dairy
215 cooperatives and farmer associates, and Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio
216 Grande do Sul (UNIJUÍ).

217 **Compliance with ethical standards** This work was performed with the consent of all
218 farmers in the study. All handling of animals in connection with sampling was performed,
219 considering animal welfare and following international and national guidelines.

220 **Conflict of interest** The authors report no conflict interest. The authors alone are responsible
221 for the content and writing of paper.

222

223

224 **REFERENCES**

- 225 Baruselli, P.S., Sá Filho, M.F., Ferreira, R.M., Sales, J.N.S., Gimenes, L.U., Vieira, L.M.,
226 Mendanha, M.F. and Bó, G.A., 2012. Manipulation of follicle development to ensure
227 optimal oocyte quality and conception rates in cattle, *Reproduction in Domestic*
228 *Animals*, 4, 134-41
- 229 Budihal, S.V. and Perwez, K., 2014. Leptospirosis diagnosis: Competancy of various
230 laboratory tests, *Journal of Clinical & Diagnostic Research*, 8(1), 199-202
- 231 Chadsuthi, S., Bicout, D.J., Wiratsudakul, A., Suwancharoen, D., Petkanchanapong, W.,
232 Modchang, C., Triampo, W., Ratanakorn, P. and Chalvet-Monfray, K., 2017.
233 Investigation on predominant *Leptospira* serovars and its distribution in humans and
234 livestock in Thailand, 2010-2015, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11
- 235 Correia, L., Loureiro, A.P. and Lilenbaum, W., 2017. Effects of rainfall on incidental and
236 host-maintained leptospiral infections in cattle in a tropical region, *Veterinary Journal*,
237 220, 63–64
- 238 Ellis, W.A., 2015. Animal Leptospirosis, In *Current Topics in Microbiology and*
239 *Immunology*, 387, 99–137 (Springer, Berlin, Heidelberg)
- 240 Emater, 2017. Relatório Socioeconômico da Cadeia Produtiva do Leite no Rio Grande do Sul
241 (Porto Alegre, Brazil)
- 242 Fornazari, F., Langoni, H., Marson, P.M., Nóbrega, D.B. and Teixeira, C.R., 2018. *Leptospira*
243 reservoirs among wildlife in Brazil: Beyond rodents, *Acta Tropica*, 178, 205-212
- 244 Heinemann, M.B., Garcia, J.F., Nunes, C.M., Gregori, F., Higa, Z.M.M., Vasconcellos, S.A.
245 and Richtzenhain, L.J., 2000. Detection and differentiation of *Leptospira* spp. serovars in
246 bovine semen by polymerase chain reaction and restriction fragment length
247 polymorphism, *Veterinary Microbiology*, 73, 261–267
- 248 Herrmann, G.P., Rodrigues, R.O., Machado, G., Lage, A.P., Moreira, E.C. and Leite, R.C.,

- 249 2012. Soroprevalencia de leptospirose em bovinos nas mesorregiões sudeste e sudoeste
250 do estado Rio Grande do Sul, Brasil, *Ciencia Animal Brasileira*, 13(1), 131-138
- 251 Jorge, S., Hartleben, C.P., Seixas, F.K., Coimbra, M.A.A., Stark, C.B., Larrondo, A.G.,
252 Amaral, M.G., Albano, A.P.N., Minello, L.F., Dellagostin, O.A. and Brod, C.S., 2012.
253 *Leptospira borgpetersenii* from free-living white-eared opossum (*Didelphis albiventris*):
254 First isolation in Brazil, *Acta Tropica*, 124, 147–151
- 255 Jorge, S., Monte, L.G., Coimbra, M.A., Albano, A.P., Hartwig, D.D., Lucas, C., Seixas, F.K.,
256 Dellagostin, O.A. and Hartleben, C.P., 2012. Detection of virulence factors and
257 molecular typing of pathogenic *Leptospira* from capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*),
258 *Current Microbiology*, 65, 461–464
- 259 Levett, P.N., 2001. Leptospirosis, *Clinical Microbiology*, 14, 296–326
- 260 Lilenbaum, W. and Souza, G.N., 2003. Factors associated with bovine leptospirosis in Rio de
261 Janeiro, Brazil, *Research in Veterinary Science*, 75, 249–251
- 262 Loureiro, A.P., Hamond, C., Pinto, P., Bremont, S., Bourhy, P. and Lilenbaum, W., 2016.
263 Molecular analysis of leptospire from serogroup Sejroe obtained from asymptomatic
264 cattle in Rio de Janeiro — Brazil reveals genetic proximity to serovar Guaricura,
265 *Research in Veterinary Science*, 105, 249–253
- 266 Majed, Z., Bellenger, E., Postic, D., Pourcel, C., Baranton, G. and Picardeau, M., 2005.
267 Identification of Variable-Number Tandem-Repeat Loci in *Leptospira interrogans Sensu*
268 *Stricto*, *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 539–545
- 269 Martins, G. and Lilenbaum, W., 2014. Leptospirosis in sheep and goats under tropical
270 conditions, *Tropical animal health and production*, 46(1), 11-7
- 271 Martins, G. and Lilenbaum, W., 2013. The panorama of animal leptospirosis in Rio de
272 Janeiro, Brazil, regarding the seroepidemiology of the infection in tropical regions, *BMC*
273 *Veterinary Research*, 9, 237

- 274 Monte, L.G., Jorge, S., Xavier, M.A., Leal, F.M.A., Amaral, M.G., Seixas, F.K., Dellagostin,
275 O.A. and Hartleben, C.P., 2013. Molecular characterization of virulent *Leptospira*
276 *interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae isolated from *Cavia aperea* Acta Tropica,
277 126, 164–166
- 278 Nascimento, A.L.T.O., Ko, A.I., Martins, E.A.L., Monteiro-Vitorello, C.B., Ho, P.L., Haake,
279 D.A., Verjovski-Almeida, S., Hartskeerl, R.A., Marques, M. V, Oliveira, M.C., Menck,
280 C.F.M., Leite, L.C.C., Carrer, H., Coutinho, L.L., Degrave, W.M., Dellagostin, O.A., El-
281 Dorry, H., Ferro, E.S., Ferro, M.I.T., Furlan, L.R., Gamberini, M., Giglioti, E.A., Góes-
282 Neto, A., Goldman, G.H., Goldman, M.H.S., Harakava, R., Jerônimo, S.M.B., Junqueira-
283 de-Azevedo, I.L.M., Kimura, E.T., Kuramae, E.E., Lemos, E.G.M., Lemos, M.V.F.,
284 Marino, C.L., Nunes, L.R., de Oliveira, R.C., Pereira, G.G., Reis, M.S., Schriefer, A.,
285 Siqueira, W.J., Sommer, P., Tsai, S.M., Simpson, A.J.G., Ferro, J.A., Camargo, L.E.A.,
286 Kitajima, J.P., Setubal, J.C. and Van Sluys, M.A., 2004. Comparative genomics of two
287 *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis,
288 Journal of Bacteriology, 186, 2164–72
- 289 Otaka, D.Y., Martins, G., Hamond, C., Penna, B., Medeiros, M.A. and Lilenbaum, W., 2012.
290 Serology and PCR for bovine leptospirosis: Herd and individual approaches, The
291 Veterinary Record, 170(13), 338
- 292 Ramos, A.C.F., Souza, G.N. and Lilenbaum, W., 2006. Influence of leptospirosis on
293 reproductive performance of sows in Brazil, Theriogenology, 66, 1021–1025
- 294 Saldanha, G.B., Cavazini, N.C., Silva, A.S. da, Fernandes, M.B., Badke, M.R.T. and Pivetta,
295 C.G., 2007. Sorologia positiva para *Leptospira butembo* em bovinos apresentando
296 problemas reprodutivos, Ciência Rural, 37, 1182–1184
- 297
- 298

299 **Table 1** Population data of cattle and animal herds sampled for the study of leptospirosis
 300 prevalence, divided by mesoregions of Rio Grande do Sul State.

Mesoregions	Herds		Animals*	
	Population	Sampled	Population	Sampled
Northeast/Northwest (MR1) ²	3.070	47	33.234	187
Northwest (MR2) ³	53	17	658	88
Southeast/Southwest (MR3) ¹	193	21	1930	149

301 * Cows older than 24 months; ¹Houses linked to Cooperative 1; ²Houses linked to
 302 Cooperative 2; ³Producer association.

303

304

305

306

307

308

309

310

311

312

313

314

315

316

317

318

319

320

321 **Table 2** General presentation of the epidemiological questionnaire applied to owners on dairy
 322 farms.

Characteristics	Dependent variables
Farm	Production System (Confinement, semi-confinement, extensive and semi-extensive) Technical Assistance (Agricultural Technician, Veterinary or Agronomist) Animal feed (Silage, concentrate or native pasture) Age and category of animals (calves, heifers, dairy cows and dried cows)
Reproductive Performance	Type of Reproduction used (natural breeding (NB), artificial insemination (AI) or (AI + NB). Reproductive problems (miscarriages, stillbirths, placental retention, malformations) Diagnosis of reproductive diseases (IBR, BVDV, neosporosis, brucellosis or leptospirosis)
Biosecurity	Presence of other animals (rodents, goats, sheep, pigs, dogs, cats or birds) Presence of wetlands and animal access Animal disposal (age, reproductive failure, poor production or disease) Animal replacement (purchase or own herd) Vaccination against leptospirosis Synantropic rodents control

323

324

325

326

327

328

329

330

331

332

333

334 **Table 3** Results statistical analysis Chi-square independent variable Serovar Djasiman and
 335 dependent variables reproductive and delivery problems.

Variables	Djasiman serogroup		<i>P</i> value	OR	IC 95 %
	Yes	No			
Reproductive problems	Yes 43(89,6%)	19 (70,4%)	<i>P</i> =0,0035	3,62	1,04-12,52
LGA ¹	No 5 (10,4%)	8 (29,6%)			
	Yes 20 (41,7%)	4 (14,8%)	<i>P</i> =0,017	4,11	1,22-13,73
	No 28 (58,3%)	23 (85,2%)			
RE ²	Yes 38 (79,2%)	18 (66,7%)	<i>P</i> =0,232	1,90	0,65-5,48
	No 10 (20,8%)	9 (33,3%)			
MTA ³	Yes 19 (39,6%)	6 (22,2%)	<i>P</i> =0,126	2,29	0,78-6,72
	No 29 (60,4%)	21 (77,8%)			
Placental retention	Yes 2 (4,2%)	0 (0,0%)	<i>P</i> =0,282	1,04	0,98-1,10
	No 46 (95,8%)	27 (100,0%)			
Childbirth problems	Yes 21 (43,8%)	3 (11,5%)	<i>P</i> =0,005	5,96	1,57-22,57
	No 27 (56,2%)	23 (88,5%)			
Stillbirths	Yes 9 (19,1%)	0 (0,0%)	<i>P</i> =0,017	1,24	1,07-1,42
	No 38 (80,9%)	26(100,0%)			
WCAB ⁴	Yes 9 (19,1%)	3 (11,5%)	<i>P</i> =0,401	1,82	0,44-7,40
	No 38 (80,9%)	23 (88,5%)			
Bad fetal formations	Yes 10 (21,3%)	0 (0,0%)	<i>P</i> =0,011	1,27	1,09-1,47
	No 37 (78,7%)	26 (100%)			

336 ¹Late-gestation abortion; ²Retunrs to estrus; ³Mid-trimester abortion, ⁴Weak calves after birth.

337

338

339

340

341

342

343

344

345

346

347

348 **Table 4** Results statistical analysis Chi-square independent variable Serovar Djasiman and
 349 risk factors as dependent variables

Dependent variables		Independent Variable (Serogroup Djasiman)		P value	OR	IC 95%
		Yes	No			
Leptospirosis diagnosis	Yes	27 (35,1%)	50 (64,9%)	P=0,085	0,57	0,29-1,08
	No	38 (48,7%)	40 (51,3%)			
Leptospirosis vaccination	Yes	93 (31,2%)	205 (68,8%)	P=0,072	0,69	0,45-1,03
	No	60 (39,7%)	91 (60,3%)			
Synantropic rodents	Yes	105 (39,8%)	159 (60,2%)	P=0,004	1,84	1,21-2,78
	No	47 (26,4%)	131 (73,6%)			
Wetlands	Yes	91 (39,9%)	137 (60,1%)	P=0,012	1,67	1,11-2,48
	No	61 (28,5%)	153 (71,5%)			
Cattle access to Wetlands	Yes	79 (40,3%)	117 (59,7%)	P=0,019	1,60	1,07-2,37
	No	73 (29,7%)	173 (70,3%)			
Rodent Control	Yes	147 (35,9%)	262(64,1%)	P=0,025	2,92	1,09-7,76
	No	5 (16,1%)	26 (83,9%)			

350

351

352

353

354

355

356

357

358

359

360

361

362

363

364

365

366 **Figure captions**

367 **Figure 1** Cities with dairy cattle serum samples evaluated in Rio Grande do Sul State,
368 Southern Brazil.

369 **Figure 2** Serogrups prevalence in Mesoregion 1 (A), Mesoregion 2 (B) and Mesoregion 3 (C)
370 from Rio Grande do Sul State.

371

372

373

374

375

376

377

378

379

380

381

382

383

384

385

386

387

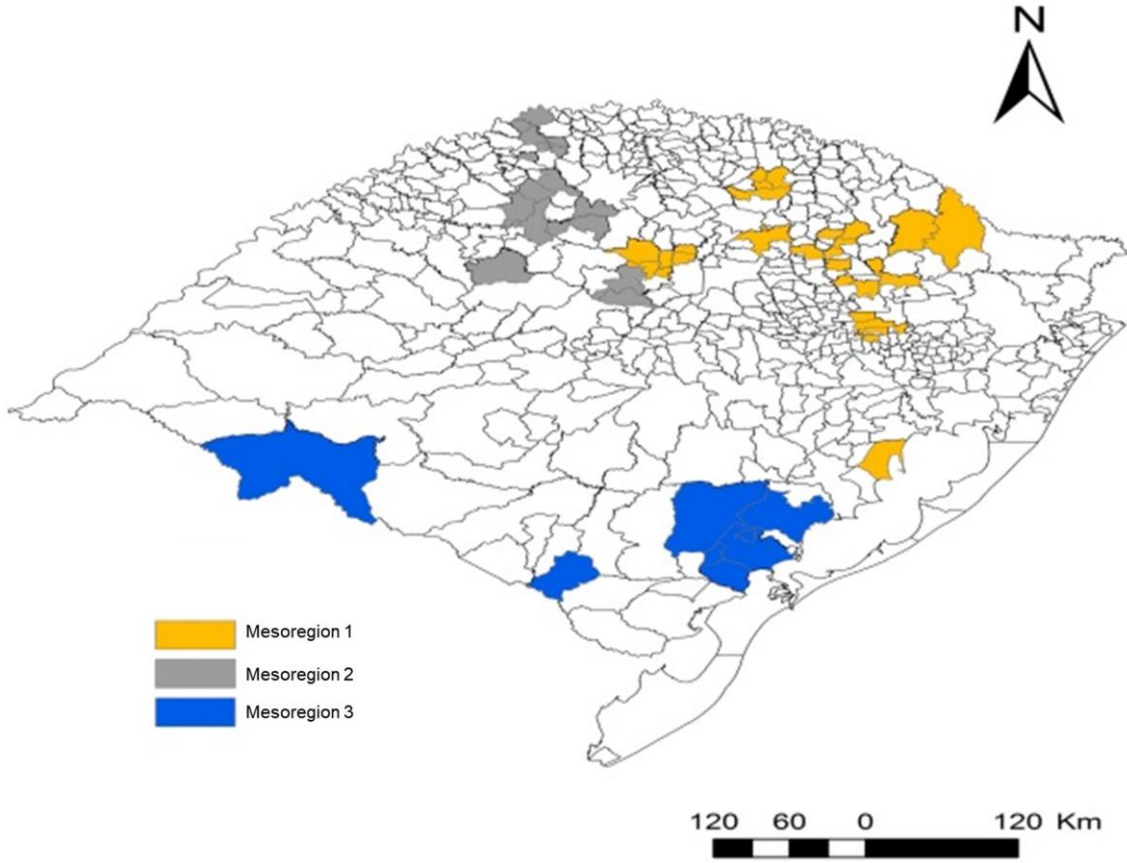
388

389

390

391 **Figure 1:**

392



393

394

395

396

397

398

399

400

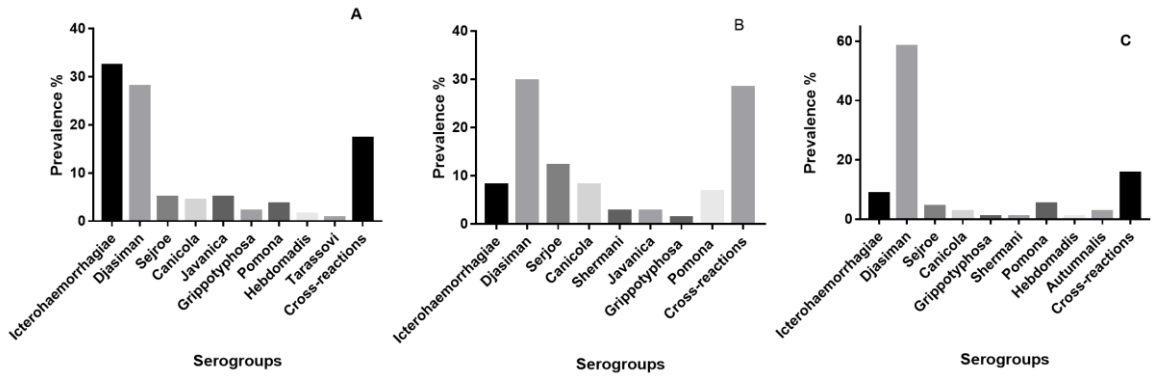
401

402

403

404

405 **Figure 2:**



406

5 Considerações Finais

Os resultados obtidos neste estudo indicam a importância do sorovar Djasiman e contribui para a literatura escassa deste sorovar no contexto das falhas reprodutivas dos bovinos. Por ser considerado não adaptado à esta espécie, portanto oriundo de infecção incidental, destaca-se a importância da realização de novos estudos epidemiológicos, para melhor caracterização deste sorovar. Sugere-se a realização de medidas de controle e prevenção nas propriedades das áreas estudadas, atuando sobre os fatores de risco que favorecem o desenvolvimento deste sorovar como controle de roedores e acesso dos animais às áreas alagadiças. Novos estudos devem ser adotados para a elaboração de uma vacina com a adição do Djasiman para assim garantir uma proteção eficiente ao rebanho na área de estudo.

Referências

ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Doenças infecciosas que impactam a reprodução de bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.41, n.1, p.133-139, 2017.

ARAUJO, M. F. M. de; COUTO, M. M. de O. **Leptospirose e Trabalho**. 2000 105 f, Florianópolis/SC, 2000.

BARUSELLI, P. S.; SÁ FILHO, M. F.; FERREIRA, R. M.; SALES, J. N. S.; GIMENES, L. U.; VIEIRA, L. M.; MENDANHA, M. F.; BÓ, G. A. Manipulation of follicle development to ensure optimal oocyte quality and conception rates in cattle, **Reproduction in Domestic Animals**, Oxford, v.47, p.134-141, 2012.

BUDIHAL, S. V.; PERWEZ, K. Leptospirosis diagnosis: Competancy of various laboratory tests, **Journal of Clinical & Diagnostic Research**, Delhi, v.8, n.1, p.199-202, 2014.

CASTRO, J. R.; SALABERRY, S. R. S.; NETO, A. B. C.; ÁVILA, D. F.; SOUZA, M. A.; LIMA-RIBEIRO, A. M. C. Leptospirose Canina—Revisão de Literatura, **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia - PUBVET**, Londrina, v.4, n.31, ed. 136, 2010.

CHADSUTHI, S.; BICOUT, D. J.; WIRATSUDAKUL, A.; SUWANCHAROEN, D.; PETKANCHANAPONG, W.; MODCHANG, C.; TRIAMPO, W.; RATANAKORN, P.; CHALVET-MONFRAY, K. Investigation on predominant *Leptospira* serovars and its distribution in humans and livestock in Thailand, 2010-2015, **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v.11, n.2, 2017.

CORREIA, L.; LOUREIRO, A. P.; LILENBAUM, W. Effects of rainfall on incidental and host-maintained leptospiral infections in cattle in a tropical region, **Veterinary Journal**, Rio de Janeiro, v.220, p.63–64, 2017.

CORREIA, L.; MARTINS, G.; LILENBAUM, W. Detection of anti-*Leptospira* inhibitory antibodies in horses after vaccination. **Microbial Pathogenesis**, Rio de Janeiro, v.110, p.494-496, 2017.

ELLINGHAUSEN, H. C.; MCCULLOUGH, W. G. Nutrition of *Leptospira Pomona* and growth of 13 other serotypes: fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80. **American journal of veterinary research**, v. 26, p. 45–51, 1965.

ELLIS, W. A. **Animal Leptospirosis**, In: Current Topics in Microbiology and Immunology, Berlin, v.387, p.99–137, 2015.

EMATER. Rio Grande do Sul/ASCAR. **Relatório socioeconômico da cadeia produtiva do leite no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, RS, 64 p., 2017.

FAVERO, J. F.; De ARAÚJO, H. L.; LILENBAUM, W.; MACHADO, G.; TONIN, A. A.; BALDISSERA, M.D.; STEFANI, L. M.; Da SILVA, A. S. Bovine Leptospirosis: Prevalence, associated risk factors for infection and their cause-effect relation. **Microbial Pathogenesis**, Amsterdam, v.107, p.149-154, 2017.

FORNAZARI, F.; LANGONI, H.; MARSON, P. M.; NÓBREGA, D. B.; TEIXEIRA, C. R. *Leptospira* reservoirs among wildlife in Brazil: Beyond rodents, **Acta Tropica**, Rio de Janeiro, v.178, p.205-212, 2018.

HASHIMOTO, V. Y.; GARCIA, K. A. H.; SPOHR, F. G. da S.; ALVES, L. A.; De FREITAS, J. C. Prevalência de anticorpos contra *Leptospiras* spp. Em bovinos, caninos, equinos, ovinos e suínos do município de Jaguapitã, Estado do Paraná, Brasil. São Paulo, **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, n.3, p.521-524, 2010.

HARTLEBEN, C. P.; BROD, C. S. Leptospirose. In: JUNIOR, J.S.; PEGORARO, L.M.C; ZANELA, M. B. **Tecnologias para Sistemas de Produção de Leite**. Brasília: Embrapa. 2016. Cap.13, p.281-290.

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

HERRMANN, G. P.; RODRIGUES, R. O.; MACHADO, G.; LAGE, A. P.; MOREIRA, E. C.; LEITE, R. C. Soroprevalência de leptospirose em bovinos nas mesorregiões Sudeste e Sudoeste do estado Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.13, n.1, p.131-138, 2012.

IBGE. **Produtos de origem animal, por tipo de produto. 2016.** Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/74#resultado>>. Acesso em: 10 nov.2017.

IBGE. **Efetivo dos rebanhos (Cabeças). 2017–Brasil e Grande Região–2017.** Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/22648-ppm-2017-rebanho-bovino-predomina-no-centro-oeste-e-mato-grosso-lidera-entre-os-estados>> Acesso: 06 fev 2019.

JORGE, S.; HARTLEBEN, C. P.; SEIXAS, F. K.; COIMBRA, M. A. A.; STARK, C. B.; LARRONDO, A. G.; AMARAL, M. G.; ALBANO, A. P. N.; MINELLO, L. F.; DELLAGOSTIN, O. A.; BROD, C. S. *Leptospira borgpetersenii* from free-living white-eared opossum (*Didelphis albiventris*): First isolation in Brazil, **Acta Tropica**, Rio de Janeiro, v.124, p.147–151, 2012.

JORGE, S.; MONTE, L. G.; COIMBRA, M. A.; ALBANO, A. P.; HARTWIG, D. D.; LUCAS, C.; SEIXAS, F. K.; DELLAGOSTIN, O. A.; HARTLEBEN, C. P., Detection of virulence factors and molecular typing of pathogenic *Leptospira* from capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*), **Current Microbiology**, Berlin, v.65, p.461–464, 2012.

JULIANO, R. S.; CHAVES, N. S. T.; Dos SANTOS, C. A.; RAMOS, L. S.; Dos SANTOS, H. Q.; MEIRELES, L. R.; GOTTSCHALK, S.; FILHO, R. A. C. C. Prevalência e aspectos epidemiológicos da leptospirose bovina em rebanho leiteiro na microrregião de Goiânia–Go, **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, n.5, 2000.

JUNG, C. F.; JÚNIOR, A. A. M. Produção leiteira no Brasil e características da bovinocultura leiteira no Rio Grande do Sul. **Revista de História e Geografia Ágora** Santa Cruz do Sul, v.19, n.1, .p. 34-47. 2017.

LANGONI, H.; Da SILVA, A. V.; SEGISMUNDO, R.; LUCHEIS, S. B.; PAES, A. C. Variáveis epidemiológicas e alterações clínicas, hematológicas e urinárias em cães sororreagentes para *Leptospira* spp **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.34, n. 2, p.765-776, 2013.

LEVETT, P. N. Leptospirosis, **Clinical Microbiology**, v.14, p.296–326, 2001.

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

LIBONATI, H. A.; SANTOS, G. B.; SOUZA, G. N., BRANDÃO, F. Z.; LILENBAUM, W. Leptospirosis is strongly associated to estrus repetition on cattle, **Tropical Animal Health en Production**, Berlin, 2018.

LOUREIRO, A. P.; HAMOND, C.; PINTO, P.; BREMONT, S.; BOURHY, P.; LILENBAUM, W. Molecular analysis of leptospire from serogroup Sejroe obtained from asymptomatic cattle in Rio de Janeiro-Brazil reveals genetic proximity to serovar Guaricura, **Research in Veterinary Science**, Rio de Janeiro, v.105, p.249–253, 2016.

MAJED, Z.; BELLENGER, E.; POSTIC, D.; POURCEL, C.; BARANTOM, G.; PICARDEAU, M. Identification of Variable–Number Tandem–Repeat Loci in *Leptospira interrogans* Sensus Sctricto, **Journal of Clinical Microbiology**, Orsay, v.44, n.2, p.539-545, 2005.

MARTINS, G.; LILENBAUM, W., Leptospirosis in sheep and goats under tropical conditions, **Tropical animal health and production**, Berlin, v.46, n.1, p.11-7, 2014.

MARTINS, G.; LILENBAUM, W. The panorama of animal leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil, regarding the seroepidemiology of the infection in tropical regions, **BMC Veterinary Research**, Berlin, v. 237, n.9, p.1-7, 2013.

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

MOHAMMED, H.; NOZHA, C.; HAKIM, K.; ABDELAZIZ, F.; REKIA, B. LEPTOSPIRA: Morphology, Classification and Pathogenesis, **Journal of Bacteriology and Parasitology**, Brussels, v.2, p.1-6, 2011.

MONTE, L. G.; JORGE, S.; XAVIER, M. A.; LEAL, F. M. A.; AMARAL, M. G.; SEIXAS, F. K.; DELLAGOSTIN, O. A.; HARTLEBEN, C. P. Molecular characterization of virulent *Leptospira interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae isolated from *Cavia aperea*, **Acta Tropica**, Rio de Janeiro, v.126, p.164–166, 2013.

MORAIS, E. G. F. **Estudo geo-epidemiológico da infecção por *Leptospira sp* em bovinos, felinos e roedores na Ilha de Fernando de Noronha, estado de Pernambuco, Brasil**, 2017. 54f. Dissertação (Mestrado em biociência Animal). Programa de Pós graduação em Biociência Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

NASCIMENTO, A. L. T. O.; KO, A. I.; MARTINS, E. A. L.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; HO, P. L.; HAAKE, D. A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; HARTSKEERL, R. A.; MARQUES, M. V.; OLIVEIRA, M. C.; MENCK, C. F. M.; LEITE, L. C. C.; CARRER, H.; COUTINHO, L. L.; DEGRAVE, W. M.; DELLAGOSTIN, O. A.; EL-DORRY, H.; FERRO, E. S.; FERRO, M. I. T.; FURLAN, L. R.; GAMBERINI, M.; GIGLIOTI, E. A.; GÓES-NETO, A.; GOLDMAN, G. H.; GOLDMAN, M. H. S.; HARAKAVA, R.; JERÔNIMO, S. M. B.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; KIMURA, E. T.; KURAMAE, E. E.; LEMOS, E. G. M.; LEMOS, M. V. F.; MARINO, C. L.; NUNES, L. R.; DE OLIVEIRA, R. C.; PEREIRA, G. G.; REIS, M. S.; SCHRIEFER, A.; SIQUEIRA, W. J.; SOMMER, P.; TSAI, S. M.; SIMPSON, A. J. G.; FERRO, J. A.; CAMARGO, L. E. A.; KITAJIMA, J. P.; SETUBAL, J. C.; VAN SLUYS, M. A. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis, **Journal of Bacteriology**, Berlin, v.186, n.7, p.2164–2172, 2004.

NAGALINGAM, M.; THIRUMALESH, S. R. A.; KALLESHAMURTHY, T.; NIHARIKA, N.; BALAMURUGAN, V.; SHOME, R.; SENUPTA, P. P.; SHOME, B. R.; PRABHUDAS, K.; RAHMAN, H. Comparative evaluation of recombinant Lig B protein and heat-killed antigen-based latex agglutination test with microscopic agglutination test for diagnosis of bovine leptospirosis, **Tropical. Animal. Health en Production**, Berlin, v. 47, n.7, p. 1329-35, 2015.

OIE, **OIE Terrestrial Manual. 2014**. Disponível em:<
http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.01.12_LEPTO.pdf>
 Acesso em: 08 fev 2019.

OLALDE, A. R.; HAAS, J. M. Estrutura agrária e desenvolvimento humano: uma análise comparativa das mesorregiões Sudoeste e Noroeste do Rio Grande do Sul. **Ensaio FEE**, Porto Alegre, v.37, n.4, p.975-1004, 2017.

OLIVEIRA, S. V.; ARSKY, M. de L. N. S.; CALDAS, E. P. de. Reservatórios animais da leptospirose: Uma revisão bibliográfica, **Revista Saúde**, Santa Maria, v.39, n.1, p. 9-20, 2013.

OTAKA, D. Y.; MARTINS, G.; HAMOND, C.; PENNA, B.; MEDEIROS, M. A.; LILENBAUM, W. Serology and PCR for bovine leptospirosis: Herd and individual approaches, *The Veterinary Record*, v.170, n.13, p.338, 2012.

PICARDEAU, M. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? **Nature Reviews Microbiology**, Berlin, p.1- 11, 2017.

PINTO, P. da S.; LIBONATI, H.; PENNA, B.; LILENBAUM, W. A systematic review on the microscopic agglutination test seroepidemiology of bovine leptospirosis in

Latin America. **Tropical. Animal. Health en Production**, Berlin, v.48, n.2, p.239-48. 2015.

RAMOS, A. C. F.; SOUZA, G. N.; LILENBAUM, W. Influence of leptospirosis on reproductive performance of sows in Brazil, **Theriogenology**, Berlin, v.66, p.1021–1025, 2006.

ROLIM, M. B. Q.; BARROS, S.E. M.; SILVA, V.C.L.; SANTANA, V. L. A; SOUZA, M. A.; HARROP, M. H. V.; MOTA, R. A.; OLIVEIRA, M. A. L.; MOURA, A. P. B. L ;LIMA, P. F. , Leptospirose em bovinos: revisão [Leptospirosis in cattle :review] **Medicina Veterinária**, v.6, n.2, p.26-31, 2012.

SALDANHA, G. B.; CAVAZINI, N. C.; SILVA, A. S. da; FERNANDES, M. B.; BADKE, M. R. T.; PIVETTA, C. G. Sorologia positiva para *Leptospira* butembo em bovinos apresentando problemas reprodutivos, **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, p.1182–1184, 2007.

SIMÕES, L. S.; SASAHARA, T. M. de C; FAVARON, P. O.; MIGLINO, M. A.; Leptospirose – Revisão. **Publicações em Medicina Veterinária – PUBVET**, Maringá, v.10, n.2, p.138-146, 2016.

SOUZA, M. A. de; CASTRO, J. R. de; TAVARES, T. C. F.; SOARES, P. M.; SANTOS, M. P.; SILVA, H. O.; LIMA-RIBEIRO, A. M. C. Padronização e Validação de ELISA indireto para o diagnóstico de leptospirose bovina. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, n.6, p. 993-999, 2012.

THIBEAUX, R.; GIRAULT, O.; BIERQUE, E.; SOUPÉ-GILBERT, M. E.; RERTTINGER, A.;DOUYERE, A.; MEYER, M.; IRAOLA, G.; PICARDEAU, M.; GOARANT, C. Biodiversity of Environmental *Leptospira*: Improving identification and Reversiting the Diagnosis, **Frontiers in Microbiology**, Switzerland, v.9, a.816, p.1-4, 2018.

TOMICH, R. G. P; BOMFIM, M. R. Q.; KOURY, M. C.; PELLEGRIN, A. O.; PELLEGRIN, L. A.; KO, A. I.; STANCIOLI, E. F. B. Leptospirosis Serosurvey in Bovines from Brazilian Pantanal using IgG ELISA with recombinant Protein LipL32 and Microscopic Agglutination Test. **Journal of Microbiology**, Berlin, n.38, p. 674-680, 2007.

VIU, M. A. de O.; DIAS, L. R. O.; LOPES, D. T.; VIU, A. F. M.; FERRAZ, H. T. Rinotraqueíte Infecciosa Bovina: Revisão, **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia-PUBVET**, Londrina, v.8, n.4, 2014a.

VIU, M. A. de O.; DIAS, L. R. O.; LOPES, D. T.; VIU, A. F. M.; FERRAZ, H. T. Diarréia Viral Bovina: Revisão, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia-PUBVET, Londrina, v.8, n.3, 2014b.

WESCHENFELDER, S.; PIRES, N. J. A.; SCHMIDT, V. Levantamento sorológico e distribuição geográfica da leptospirose em bovinos no Rio Grande do Sul, no período de 1999 a 2001. **Pesquisa. Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v.11, n.1-2, p.89-93, 2005.

WORLD ORGANISATION FOR HEALTH **Human leptospirosis:Guidance for diagnosis, surveillance and control** .2003. Disponível

em:.<www.who.int/csr/don/en/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.23.pdf> Acesso em: 04 out. 2017

Anexos

Anexo I - Documento da Comissão de Ética e Experimentação Animal



Pelotas, 14 de janeiro de 2016.

De: M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)
Para: Prof. Odir Antônio Dellagostin
Biotecnologia – Centro de Desenvolvimento Tecnológico

Senhor Professor:

A *CEEA* analisou as correções feitas o projeto intitulado: **“Investigação sorológica e validação de ELISA combinado para diagnóstico de Leptospirose, Neosporose, Rinotraqueíte Infecciosa Bovina e Diarréia Viral Bovina”** processo nº23110.007027/2015-76, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, Subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, pois está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à *CEEA*.

Solicitamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao *COBALTO* para posterior registro no *COCEPE* (código para cadastro nº *CEEA 7027-2015*).

Vigência do Projeto: 15/01/2016 a 01/04/2016

Espécie/Linhagem: Bovina/Latheiras

Nº de animais: 410

Idade: ≥ 25 meses

Sexo: Fêmeas

Origem: Propriedades Latheiras da Região Norte do Rio Grande do Sul

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Ciente em: ____/____/2016

Assinatura do Professor Responsável: _____

Anexo II – Questionário Epidemiológico

Nome:

Cidade:

Data:

Área da propriedade:

Número total de animais na propriedade:

Número total e identificação de vacas coletadas:

Técnico que realizou o questionário:

Questionário epidemiológico

1. Tipo de exploração:

Leite Corte Misto

Produção mensal/leite:

Número de vacas em lactação:

Produção anual/carne: _____

2. Tipo de criação:

Confinado Semi-confinado Extensivo semi-extensivo

3. Tipo de cruzamento utilizado:

Monta natural (MN) Inseminação artificial (IA) IA + MN

Em caso de usar MN, compartilha o touro com outras propriedades?

Sim Não

4. Observa algum tipo de problema reprodutivo na propriedade?

Sim Não

Aborto final gestação Repetição cio Aborto meio gestação

Nenhum problema Outros:

5. Já houve diagnóstico de doença reprodutiva na propriedade?

leptospirose IBR BVD neosporose brucelose

6. Observa algum tipo de problema durante o parto na propriedade?

Sim Não

Natimortos Terneiros fracos ao nascer Má formações Nenhum problema

7. O técnico que realiza a IA é:

Terceirizado Cooperativa Da propriedade rural

Ha quanto tempo usa IA?

Possui curso de IA?

Curso de reciclagem?

8. Vacinação das doenças reprodutivas:

Leptospirose IBR/BVD não vacina

Quando e qual vacina utilizada e a frequencia?

9. Raças predominantes

- HO JE Girolando SRD
 Outras especificar:

10. Presença de outros animais na propriedade?

- Sim Não
 Ovinos Suínos Aves Roedores
 Outros:

11. Áreas alagadiças na propriedade

- Sim Não

12. Os animais têm acesso às áreas alagadas em algum momento?

- Sim Não

13. A propriedade recebe assistência técnica?

- Veterinário Agrônomo Técnico agrícola Nenhuma assistência técnica

14. Tipo de ordenha:

- Manual Mecânica

15. Existe piquetes para pré parto/parição

- Sim Não

16. Há controle de roedores/ animais silvestres?

- Sim Não

17. Tipo de alimentação do gado

- pastagem cultivada silagem ração campo nativo melhorado
Tipo de pastagem:

18. Reposição de animais

- próprio rebanho compra ambos

19. Coordenadas geográficas: LA

LO

20. Período de secagem das vacas

- 60 dias antes do parto 30 dias antes do parto não faz outro_____

21. Critério de descarte dos animais

- idade falha reprodutiva venda comercial produção
 doenças:
-

Anexo III–Coordenadas Geográficas das Propriedades analisadas

Mesorregião	Propriedade	Coordenadas Geográficas	
1	1	LA- 29,3324 47	LO- 51,4986 68
1	3	LA- 29,3069 8	LO- 51,4372 217
1	4	LA- 29,2066 617	LO- 51,59517
1	5	LA- 29,3893 45	LO- 51,528854
1	6	LA- 29,347885	LO- 51,287734
1	7	LA- 29,331422	LO- 51,453895
1	8	LA- 29,3150083	LO- 51,411495
1	9	LA- 29,3222683	LO- 51,459633
1	10	LA- 29,339839	LO- 51,510082
1	11	LA- 29,323617	LO- 51,455825
1	21	LA-28,9774233	LO-51,4943
1	22	LA-28,8627617	LO-51,674545
1	23	LA-28,739682	LO-51,505110
1	24	LA-28,908770	LO-51,374707
1	25	LA-28,858836	LO-51,224008
1	26	LA-28,417295	LO-51,159114
1	27	LA-28,5574	LO-50,98589
1	28	LA-28,9185283	LO-51,5670183
1	41	LA-27,965327	LO-52,509502
1	42	LA- 27,86543	LO-52,257665
1	43	LA-27,842980	LO-52,244924
1	44	LA-28,001006	LO-52,082809
1	45	LA-27,817532	LO-52,324121
1	46	LA-27,8894317	LO-52,283575
1	47	LA-27,8905617	LO-52,358865
1	49	LA-28,00557	LO-52,1202467
2	50	LA-28 11' 00,46	LO-54 00'34,32"
2	51	LA-28 41'	LO-54 12' 43"
2	52	LA-28 19' 13,51"	LO-53 44' 30,62"
2	54	LA-28 15' 06"	LO-53 37' 13"
2	56	LA-28 40' 00,60"	LO-53 12' 30,70"
2	57	LA-27 24' 25,11"	LO-53 58'26,44"
2	58	LA-27 17' 13,19"	LO-53 52' 26,09"
2	59	LA-28 27' 18,16"	LO-53 53' 33,14"
2	60	LA-27 30' 40,56"	LO-53 50' 03, 56"
2	61	LA-27 21' 23,90"	LO-54 01' 07, 70"
2	62	LA-27 36' 41,82"	LO-53 45'35,46"
2	63	LA-27' 32' 40,4"	LO-53' 41' 11,5"
2	64	LA-27 55' 07,37"	LO-53 58' 44,26"
3	67	LA- 31°42'31.10"S	LO-52°32'14.34"O
3	68	LA-31° 44' 45.79" S	LO-52° 42' 47.99" O
3	69	LA-31°47'10.62"S	LO-52°38'14.15"O
3	70	LA- 31° 40' 58.81" S	LO-52° 31' 37.98" O
3	71	LA- 31°16'13.09"S	LO- 52° 4'0.59"O
3	72	LA- 31° 40' 58.81" S	LO-52° 31' 37.98" O

3	73	LA- 31°29'36.43"S	LO- 52°25'1.81"O
3	74	LA-31 ⁰ 36' 43"	LO-52 ⁰ 40' 56"
3	75	LA- 31°28'20.36"S	LO- 52°21'46.61"O
3	76	LA-31 ⁰ 31' 10.41" S	LO-52 ⁰ 23' 13.91" O
3	77	LA- 31°43'36.19"S	LO-52°40'40.61"O
3	78	LA- 31°25'33.91"S	LO-52°23'34.02"O
3	79	LA-31°23'37.97"S	LO-52°22'6.06"O
3	80	LA-31° 9'53.10"S	LO- 52°28'55.73"O
3	81	LA- 52°38'14.15"O	LO-52°31'56.56"O
3	82	LA- 31°20'1.73"S	LO-52°38'7.82"O
3	83	LA-31°44'14.76"S	LO-53°35'06.74"O
3	85	LA-31°28'23.43"S	LO-52°41'18.50"O
3	88	LA-31°38'9.10"S	LO-52°24'28.56"O
