

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**SITUAÇÃO DA LEPTOSPIROSE EM BOVINOS DESTINADOS AO ABATE NO  
TRIÂNGULO MINEIRO: SOROLOGIA, ISOLAMENTO E EPIDEMIOLOGIA**

**Pollyanna Mafra Soares**

Médica Veterinária

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL

2018

**POLLYANNA MAFRA SOARES**

**SITUAÇÃO DA LEPTOSPIROSE EM BOVINOS DESTINADOS AO ABATE NO  
TRIÂNGULO MINEIRO: SOROLOGIA, ISOLAMENTO E EPIDEMIOLOGIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária – UFU, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Saúde Animal

Orientadora: Anna Monteiro Correia Lima

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

S676s  
2018 Soares, Pollyanna Mafra, 1984  
Situação da leptospirose em bovinos destinados ao abate no Triângulo Mineiro: sorologia, isolamento e epidemiologia / Pollyanna Mafra Soares. - 2018.  
99 f. : il.

Orientador: Anna Monteiro Correia Lima.  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.  
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2018.476>  
Inclui bibliografia.

1. Veterinária - Teses. 2. Leptospirose em animais - Teses. 3. Leptospirose em animais - Epidemiologia - Teses. 4. Bovino - Doenças - Teses. I. Lima, Anna Monteiro Correia. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

---

CDU: 619

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



Ata da defesa de TESE DE DOUTORADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa de: TESE DE DOUTORADO Nº PPGCV/008/2018

Data: 16/04/2018

Discente: *Pollyanna Mafra Soares* – Matrícula – 11323VET005

Título da Tese: SITUÇÃO DA LEPTOSPIROSE EM BOVINOS DESTINADOS AO ABATE NO TRIÂNGULO MINEIRO: SOROLOGIA, ISOLAMENTO E EPIDEMIOLOGIA

Área de concentração: SAÚDE ANIMAL

Linha de pesquisa: CLÍNICA MÉDICA E INVESTIGAÇÃO ETIOLÓGICA

Projeto de Pesquisa de vinculação: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E LABORATORIAIS DA OCORRÊNCIA DA LEPTOSPIROSE EM ANIMAIS DOMÉSTICOS DO TRIÂNGULO MINEIRO

Aos 16 dias do mês de abril do ano de 2018 às 08.00 horas no Auditório do Bloco 4K – Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Comissão Julgadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, composta pelos Professores/Doutores: João Helder Frederico de Faria Naves – FACULDADE PRESIDENTE ANTONIO CARLOS DE UBERLÂNDIA; Jean Ezequiel Limongi – UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA; Walter Lilienbaum – UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE; Rosuita Fratari Bonito – UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA e Anna Monteiro Correia Lima orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da comissão Dr./Dra. Anna Monteiro Correia Lima concedeu a palavra ao/a candidato(a) para a exposição do seu trabalho, contando com o tempo máximo de 50 minutos. A seguir o(a) senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o(a) candidato(a), durante o prazo máximo de (30) minutos, assegurando-se a mesma igual prazo para resposta. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Comissão Julgadora, em sessão secreta, considerou o(a) candidato(a) APROVADA.

Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme Regulamento do Programa, Legislação e a Regulamentação Interna da UFU.

Os trabalhos foram encerrados às 12 horas e 20 minutos, e para constar, lavrou-se a presente ata que será assinada pelos membros da Comissão Examinadora. Uberlândia, 16 de abril de 2018.

  
Prof. Dr. Jean Ezequiel Limongi

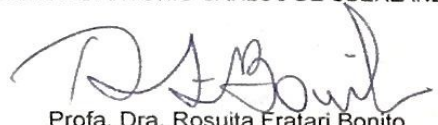
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

  
Prof. Dr. João Helder Frederico de Faria Naves

FACULDADE PRESIDENTE ANTONIO CARLOS DE UBERLÂNDIA

  
Prof. Dr. Walter Lilienbaum

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE

  
Profa. Dra. Rosuita Fratari Bonito

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

  
Profa. Dra. Anna Monteiro Correia Lima

ORIENTADORA

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela condição física e intelectual que me permitiram chegar até aqui, e mesmo com todas as dificuldades enfrentadas, nunca me deixou no alento, foi possível sentir a sua presença em todos os momentos.

Aos meus pais, Mafra e Joaquim, que me concederam a vida e me criaram com muito carinho e amor, além de serem meu alicerce para construção de valores íntegros e meu incentivo para seguir na vida acadêmica e de pesquisa. Amo vocês!

Aos meus irmãos, Robson (Robinho) e Mayara (Yayá), a minha cunhada Natássia e ao meu cunhado Pio, que com todo o seu amor, carinho e compreensão, estiveram sempre ao meu lado me apoiando. Amo vocês!

Em especial, a minha irmã, Mayara, que fez a mesma escolha profissional que a minha, e por isso além da irmandade, compartilhamos ajuda uma a outra. Aquela que sempre que pôde, foi comigo em algumas coletas, ajudou no processamento de amostras noite adentro, que sempre esteve disposta a me auxiliar em tudo que precisei.

As minhas sobrinhas e afilhadas amadas, Pietrinha e Anninha, que são uma das minhas joias mais preciosas, pelas quais nutro um amor imensurável e que tornam a minha caminhada muito mais leve, cheia de doces e travessuras.

Ao meu noivo e futuro marido Fernando, que esteve ao meu lado sempre me apoiando por longos 16 anos de minha vida, mesmo quando apenas na condição de amigo. Aquele que nunca me negou ajuda, mesmo reclamando (rsrsrsrs), acordou de madrugada para me auxiliar nas coletas, me ajudou na preparação de materiais do meu experimento, na visualização das leptospiros, além de passar noites em claro no processamento das amostras coletadas. Aquele que é paciente, que compreende todos os meus afazeres e sabe esperar o tempo de tudo. E aquele que me dá todo seu amor e cuida de mim em todos os momentos. Te amo!

A minha filha de quatro patas, Leona, a minha sogra e sogro, cunhados e concunhadas, sobrinho e sobrinhas pelo carinho e compreensão.

A minha mana e amiga do coração, Karlinha, que foi a peça crucial para que algumas amostras do meu experimento fossem coletadas, pois interveio na empresa onde trabalha para conseguir a autorização das coletas e até mesmo me ajudou em todas elas. Aquela que além de me ajudar profissionalmente, é minha irmã de vida, que topa fazer todas as loucuras que proponho (rsrsrsrs), companheirona pra tudo, viagens, festas, passeios, cervejinha no bar, até mesmo nas aulas de espanhol e na sinuca.

As minhas outras irmãs de vida, Flaida e Aline Nayana, que me apoiam em tudo, e podem vir obstáculos e distância, que sempre seremos pregadas por muitos e muitos anos. Obrigada pelos 18 anos de amizade!!!

A minha amiga do LADOC Dayane (Xayzinha), que tem um coração enorme e não mede esforços pra ajudar. Foi em todas as minhas coletas, esteve em quase todos os meus processamentos de amostras, participou de praticamente tudo no meu experimento. Sou muito grata a você Xayzinha e nunca esquecerei das nossas conversas, um tanto quanto malucas, pra poder aguentar o sono após 24h acordadas no processamento das amostras. E ufaaaa... Deu muito certo, isolamos uma estirpe, ebaaa!!! Valeu por tudo!!!

Aos amigos LADOC, Andreia, Danilo e Lais, que também me ajudaram muito no experimento!!! Muito obrigada!!!

A minha amiga LADOC, Lígia, que me ajudou a fazer o teste sorológico de praticamente todas as amostras, durante a semana, sábados e feriados. De uma humildade e competência exemplar. Obrigada por tudo Liginha e muito sucesso na sua vida!!!

Aos velhos e novos amigos LADOC, João Helder, Tatiane, Mariana, Mariane, Muriell, Rafael (Beletim), Gabriela, Dayane, Andreia, Laís, Thais, Lígia, Bruno, Danilo, Vinicius, Felipe, Carol, Ana Bui, muito obrigado pelos momentos vividos, pelas festinhas únicas e pelas trocas de experiências profissionais, vou guardar tudo sempre com muito carinho.

As meninas da célula, muito obrigada pela amizade e pelos pedidos de oração realizados para que tudo desse certo em minha defesa de doutorado.

Aos velhos e novos amigos de vida, Karla e Daniel (The Venâncio), Fabrício (Véio) e Camila, Vinícius (Et) e Jaqueline (Bisquizinha), Nayara e Brunno, Flaida e Daniel, Pedro, obrigada pelos ótimos momentos que passamos juntos nesses anos, vocês tornaram a minha caminhada muito mais leve para chegar até aqui.

Aos técnicos do LADOC, pela colaboração, em especial, Marília, pela amizade.

A professora Anna, minha eterna orientadora (rsrsrs), por todos os ensinamentos, pela amizade e pela compreensão. Se a escolhi para auxiliar-me na condução da monitoria, graduação, mestrado e doutorado, é porque te admiro muito, e a minha admiração vai além do profissional, pelo grande ser humano que você é. Aquela que sabe “puxar orelha”, mas que também sabe distribuir carinhos e trata todos seus orientados como se fossem filhos, além de sempre preservar a união em qualquer grupo que lidera. Orgulho-me muito em dizer que você foi a minha orientadora. Muito obrigada por tudo e por me aturar todos esses anos!

Aos frigoríficos, Real e JBS Friboi, principalmente à Carol, Karla e Dr. Carlos, que me permitiram a coleta de amostras para a realização do meu experimento.

Ao Prof. Dr. Walter Lilenbaum, da Universidade Federal Fluminense (UFF), pela parceria e por todo suporte na identificação e caracterização do meu isolado.

A Dr<sup>a</sup>. Lauren, pós-doutoranda da Universidade Federal Fluminense (UFF), por todos os ensinamentos compartilhados e pela imensa cooperação no processo final da escrita da Tese.

***"Agradeço todas as dificuldades que enfrentei,  
Se não fosse por elas, eu não teria saído do lugar.  
As facilidades nos impedem de caminhar.  
Até mesmo as críticas nos auxiliam muito."***

**(Chico Xavier)**

## SITUAÇÃO DA LEPTOSPIROSE EM BOVINOS DESTINADOS AO ABATE NO TRIÂNGULO MINEIRO: SOROLOGIA, ISOLAMENTO E EPIDEMIOLOGIA

**RESUMO** – O primeiro capítulo foi denominado “Considerações Gerais”, no qual foi realizada uma breve revisão de literatura sobre o que foi abordado no trabalho. No segundo capítulo, objetivou-se identificar a frequência de anticorpos anti-*Leptospira* e avaliar os aspectos epidemiológicos da leptospirose bovina nos rebanhos do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba. Foram coletadas, em frigoríficos, 372 amostras de soro sanguíneo de bovinos machos e fêmeas provenientes de 15 propriedades localizadas em 12 diferentes municípios da região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba. As amostras foram submetidas ao teste de Soroaglutinação microscópica (MAT), utilizando-se 16 sorogrupos com 23 sorovariedades de *Leptospira* spp.. Dentre as amostras avaliadas, 267/372 (71,8%) foram reagentes a títulos  $\geq 100$ , principalmente para os sorogrupos Sejroe, Tarassovi e Hebdomadis. No MAT de titulação, verificou-se que 178/267 (66,7%) amostras reagentes apresentaram maior frequência de títulos  $\geq 200$  para os sorogrupos Tarassovi (99/267 – 37,1%), Sejroe (43/267 – 16,1%), Hebdomadis (15/267 – 5,6%). Dentre os sorovares presentes em altos títulos por sorogrupo mais frequente, o Guaricura e o Hebdomadis, não são encontrados nas vacinas comercializadas no Brasil, enquanto o Tarassovi é encontrado em apenas duas marcas comerciais. Acredita-se que estes sorovares podem estar sendo transmitidos entre os bovinos ou por outras espécies domésticas e silvestres por meio da contaminação do ambiente com urina de animais infectados. Desta forma, conclui-se que a leptospirose no Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, está presente em alta frequência em bovinos, sendo causada por sorogrupos não específicos ou que não estão presentes nas vacinas nacionais, necessitando de medidas de controle mais efetivas. No terceiro capítulo, realizou-se o isolamento, a caracterização sorológica e molecular de uma estirpe de *Leptospira* da urina de um bovino macho destinado ao abate sem alterações no exame *ante-mortem*. A estirpe isolada foi denominada UFU02, sendo o primeiro relato de isolamento de *Leptospira kirschneri* sorogrupo Grippotyphosa em bovinos no estado de Minas Gerais, Brasil. O sorogrupo identificado é mais frequentemente encontrado em espécies silvestres, destacando a importância dos isolamentos para conhecer os aspectos epidemiológicos da doença e estabelecer métodos profiláticos mais eficientes, impedindo a transmissão da doença para animais domésticos e seres humanos. No quarto capítulo, objetivou-se avaliar a reatividade ao MAT de 372 amostras de soro sanguíneo do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, com e sem a adição da estirpe UFU02 no painel de antígenos de estirpes de referência. No teste empregando-se apenas estirpes de referência (MAT<sub>REF</sub>), 187/372 (50,26%) foram reagentes para pelo menos uma das estirpes testadas, enquanto que no teste com o emprego estirpe isolada (MAT<sub>REF+ISO</sub>), 196/372 (52,68%) foram reagentes para pelo menos uma das estirpes de referência e de isolado local testados, não havendo coagulações para um mesmo sorogrupo entre estirpe local e de referência. Concluindo-se que a inclusão da estirpe local do sorogrupo Grippotyphosa no MAT revelou um aumento não significativo de 2,4% ( $p > 0,05$ ) do número de bovinos identificados como sororeativos, necessitando da inclusão de mais estirpes de isolados locais no painel de antígenos do MAT. No quinto capítulo, estão as “considerações finais” sobre tese, incluindo as conclusões relativas a todos os capítulos.

**Palavras-chave:** Aspectos epidemiológicos. *Leptospira*. Grippotyphosa.



## SITUATION OF LEPTOSPIROSIS IN CATTLE DESTINED TO SLAUGHTER IN TRIÂNGULO MINEIRO: SOROLOGY, ISOLATION AND EPIDEMIOLOGY

**ABSTRACT** – The first chapter was called "General Considerations", in which have a brief review of the literature about what was covered in the thesis. In the second chapter, the objective was to identify the frequency of anti-*Leptospira* antibodies and to evaluate the epidemiological aspects of bovine leptospirosis in the herds of the Triângulo Mineiro and Alto Paranaíba areas. A total of 372 blood serum samples were collected from male and female cattle from 15 farms located in 12 different municipalities in the Triângulo Mineiro and Alto Paranaíba. Samples were submitted to the microscopic Soroagglutination (MAT) test, using 16 serogroups with 23 serovars of *Leptospira* spp .. Among the samples evaluated, 267/372 (71.8%) were reagents at titre  $\geq 100$ , mainly for are the serogroups Sejroe, Tarassovi and Hebdomadis. In the titration MAT, 178/267 (66.7%) reactant samples had a higher frequency of titers  $\geq 200$  for the serogroups Tarassovi (99/267 - 37.1%), Sejroe (43/267-16, 1%), Hebdomadis (15/267 - 5.6%). Among the serovars present in high titres by the most frequent serogroup, Guaricura and Hebdomadis, are not found in vaccines marketed in Brazil, while Tarassovi is found in only two commercial brands. It is believed that these serovars may be transmitted between cattle or other domestic and wild species by environment contamination with urine from infected animals. Thus, it is concluded that leptospirosis in the Triângulo Mineiro and Alto Paranaíba, is present in high frequency in cattle, being caused by non-specific serogroups or that are not present in the national vaccines, necessitating more effective control measures. In the third chapter, the isolation and serological and molecular characterization were performed of a strain of *Leptospira* from the urine of a male bovine destined to slaughter without changes in ante-mortem examination was carried out. The isolated strain was designated UFU02, being the first report of isolation of *Leptospira kirschneri* serogruppo Grippotyphosa in cattle in the state of Minas Gerais, Brazil. The identified serogroup is most frequently found in wild species, highlighting the importance of isolates to know the epidemiological aspects of the disease and to establish more efficient prophylactic methods, preventing the transmission of the disease to domestic animals and humans. In the fourth chapter, the objective was to evaluate the reactivity to the MAT of 372 blood serum samples from the Triângulo Mineiro and Alto Paranaíba, with and without the addition of strain UFU02 in the panel of antigens of reference strains. In the test using only reference strains (MAT<sub>REF</sub>), 187/372 (50.26%) were reagents for at least one of the strains tested, whereas in the test with the isolated strain (MAT<sub>REF + ISO</sub>), 196 / 372 (52.68%) were reactants for at least one of the reference strains and local isolates tested, there being no coagglutination for the same serogroup between local and reference strain. It was concluded that the inclusion of the local strain of the Grippotyphosa serogroup in the MAT revealed a non-significant increase of 2.4% ( $p > 0.05$ ) in the number of cattle identified as seroreactive, requiring the inclusion of additional strains of local isolates in the panel of MAT antigens. In the fifth chapter are the "final considerations" on thesis, including the conclusions for all chapters.

**Keywords:** Epidemiological aspects. *Leptospira*. Grippotyphosa.

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| CAPÍTULO I .....  | 11 |
| CONSIDERAÇÕES GERAIS .....  | 12 |
| 1.1 Bovinocultura em Minas Gerais .....   | 12 |
| 1.2 Agente etiológico: <i>Leptospira</i> spp. ....  | 12 |
| 1.3 Leptospirose Bovina: etiologia, transmissão, patogenia e controle .....   | 17 |
| 1.4 Leptospirose Bovina: inquéritos sorológicos no Brasil .....   | 21 |
| 1.5 Leptospirose Bovina: Isolamento de estirpes de <i>Leptospira</i> spp. no Brasil .....   | 23 |
| 1.6 Técnicas de diagnóstico para leptospirose bovina .....  | 26 |
| 1.6.1 Métodos Indiretos .....   | 26 |
| 1.6.1.1 Teste de Soroaglutinação Microscópica (MAT) .....   | 26 |
| 1.6.2 Métodos Diretos .....   | 27 |
| 1.6.2.1 Cultivo bacteriológico – Isolamento .....   | 27 |
| 1.6.2.2 Diagnósticos moleculares .....  | 30 |
| REFERÊNCIAS .....   | 33 |
| CAPÍTULO II .....   | 48 |
| Alta frequência dos sorogrupos Sejroe, Tarassovi e Hebdomadis em bovinos da região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, Minas Gerais, Brasil .....                      | 49 |
| ABSTRACT .....  | 49 |
| RESUMO .....  | 49 |
| INTRODUÇÃO .....  | 50 |
| MATERIAL E MÉTODOS .....  | 51 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO .....  | 53 |
| CONCLUSÃO .....   | 59 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....  | 59 |
| CAPÍTULO III .....  | 70 |
| Identificação sorológica e molecular da primeira estirpe de <i>Leptospira kirschneri</i> sorogrupo Grippotyphosa isolada da urina de bovino em Minas Gerais, Brasil ..... | 71 |
| RESUMO .....  | 71 |
| 1. INTRODUÇÃO .....   | 71 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS .....   | 73 |
| 2.1. Amostras .....   | 73 |
| 2.2. Preparo de amostras de urina e rim para isolamento .....   | 73 |
| 2.3. Sorogrupagem .....   | 74 |

|   |    |
|---|----|
| 2.4. Protocolo de PCR realizado no Laboratório de bacteriologia da UFF .....  | 74 |
| 2.4.1 Extração de DNA e Reação em cadeia da polimerase (PCR) .....  | 74 |
| 2.4.2. Sequenciamento nucleotídico e inferências filogenéticas .....  | 75 |
| 2.4.3. Variable-Number Tandem-Repeat (VNTR) .....   | 75 |
| 3. RESULTADOS .....   | 76 |
| 4. DISCUSSÃO .....  | 77 |
| 5. REFERÊNCIAS .....  | 80 |
| CAPÍTULO IV .....   | 83 |
| Emprego da estirpe <i>Leptospira kirschineri</i> sorogrupo <i>Grippotyphosa</i> isolada de bovino, no Triângulo Mineiro, no teste de Soroaglutinação Microscópica (MAT) ..... | 84 |
| RESUMO .....  | 84 |
| 1. INTRODUÇÃO .....   | 84 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS .....   | 86 |
| 2.1. Amostras .....   | 86 |
| 2.2. Teste de soroaglutinação microscópica (MAT) .....  | 86 |
| 2.3. Análise estatística .....  | 87 |
| 3. RESULTADOS .....   | 87 |
| 4. DISCUSSÃO .....  | 88 |
| 5. CONCLUSÃO .....  | 91 |
| 6. REFERÊNCIAS .....  | 92 |
| CAPÍTULO V .....  | 95 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS .....  | 96 |
| ANEXOS .....  | 98 |

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS

**Figura 1.** Micrografia eletrônica da *Leptospira interrogans* estirpe MGA isolada em 1915 na Bélgica ..... 13

**Figura 2.** Espécies de *Leptospira* de acordo com a análise molecular filogenética ..... 14

### CAPÍTULO II – Alta frequência dos sorogrupos Sejroe, Tarassovi e Hebdomadis em bovinos da região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, Minas Gerais, Brasil

**Figura 1.** Distribuição dos sorovares mais frequentes, em bovinos reagentes no MAT, por municípios da região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, Minas Gerais, 2018 ..... 69

### CAPÍTULO III – Identificação sorológica e molecular da primeira estirpe de *Leptospira kirschneri* sorogrupo Grippotyphosa isolada da urina de bovino em Minas Gerais, Brasil

**Figura 1.** Árvore filogenética do gene *secY* (método Máxima Verosimilhança, bootstrap de 1.000 replicatas) ..... 76

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

### CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS

**Quadro 1.** Frequência de aglutininas anti-*Leptospira* em bovinos no teste de Soroaglutinação microscópica (MAT) em vários estados brasileiros ..... 22

### CAPÍTULO II – Variantes sorológicas anti-*Leptospira* spp. em bovinos destinados ao abate na região do Triângulo Mineiro, Minas Gerais, Brasil

**Tabela 1.** Frequência de bovinos reagentes ao MAT de acordo com os municípios de origem da região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, Minas Gerais, 2018..... 66

**Tabela 2.** Frequências absoluta e relativa de bovinos reagentes por sorogrupo e sorovares no MAT em títulos  $\geq 100$ , nos municípios da região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, Minas Gerais, 2018..... 67

**Tabela 3.** Resultados de titulação (títulos de 200 a 3.200) do MAT por sorogrupo e sorovares em bovinos dos municípios da região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, Minas Gerais, 2018 ..... 68

**Tabela 4.** Principais vacinas comercializadas contra leptospirose bovina no Brasil ..... 69

### CAPÍTULO IV – Emprego da estirpe *Leptospira kirschineri* sorogrupo *Grippotyphosa* isolada de bovino, no Triângulo Mineiro, no teste de Soroaglutinação Microscópica (MAT)

**Tabela 1.** Resultados dos MAT<sub>REF</sub> e MAT<sub>REF+ISO</sub> por sorogrupo e títulos de anticorpos anti-*Leptospira* em bovinos sororeagentes abatidos no Triângulo Mineiro, Minas Gerais, 2018 ..... 88

**Tabela 2.** Perfil de VNTR das estirpes pertencentes ao sorogrupo *Grippotyphosa* utilizadas nos MAT<sub>REF</sub> e MAT<sub>REF+ISO</sub> ..... 90

## **CAPÍTULO I**

### **CONSIDERAÇÕES GERAIS**

## CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS

### 1.1 Bovinocultura no Brasil e no estado de Minas Gerais

O Brasil é considerado atualmente, um dos principais países na produção e comércio de carne bovina no mundo, devido a um processo estruturado de desenvolvimento, que alavancou a sua produtividade, bem como a qualidade do produto brasileiro, tornando-o mais competitivo e com maior abrangência de mercado (GOMES; FEIJÓ; CHIARI, 2017).

O efetivo do rebanho bovino brasileiro, em 2016, foi de 218,23 milhões de cabeças, posicionando o Brasil como o segundo maior rebanho bovino, sendo responsável por 22,2% do rebanho mundial, atrás apenas da Índia; o segundo maior produtor (16,3% da produção mundial); o segundo maior consumidor (35,8 kg/habitante/ano); e o segundo maior exportador (aproximadamente 1,9 milhões toneladas equivalente carcaça) de carne bovina do mundo, tendo abatido mais de 39 milhões de cabeças (BRASIL, 2016; ABIEC, 2017; GOMES; FEIJÓ; CHIARI, 2017).

Em Minas Gerais, o efetivo do rebanho bovino nacional foi de 23,56 milhões de cabeças, apresentando um aumento de 10,8% em relação ao ano de 2015, sendo considerado o quinto estado que mais abate bovinos no Brasil, representando 9,4% dos abates nacionais. A produção brasileira de leite em 2016 foi de 33,62 bilhões de litros, com um aumento de 2,9% em relação ao ano anterior, colocando-se em quinto lugar no ranking de produção mundial. Minas Gerais continua sendo o maior produtor, com 8,97 bilhões de litros ou 26,7% da produção nacional (BRASIL, 2016).

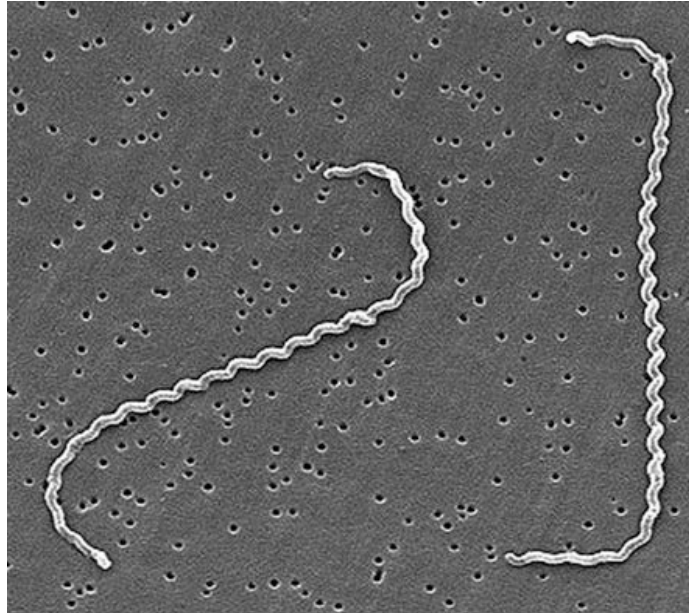
### 1.2 Agente etiológico: *Leptospira* spp.

Leptospiras são bactérias que pertencem a família *Leptospiraceae* e ordem Spirochaetales, possuem forma de espiral (Figura 1), e são móveis, aeróbicas e cultiváveis a uma temperatura ótima de crescimento de 28-30°C, que medem cerca de 6 a 25 µm de comprimento por 0,1 a 0,2 µm de diâmetro, as quais podem ser vistas em microscópio de campo escuro (FAINE et al., 1999; ACHA; SZYFRES, 2001; BHARTI et al., 2003).

A maioria das espécies de mamíferos são portadores naturais da *Leptospira*, incluindo como importantes fontes de infecção os animais silvestres, animais domésticos de produção e de estimação, portanto o risco em contrair a leptospirose está associado ao contato com ou entre essas espécies animais. Por esse motivo, a leptospirose é considerada uma doença ocupacional importante, representando um grande problema de saúde pública, principalmente para agricultores, trabalhadores de matadouros frigoríficos, comerciantes de animais de estimação, veterinários,

coletores de roedores e esgoto (LEVETT, 2001; BHARTI et al., 2003; ADLER; MOCTEAZUMA, 2010; HARTSKEERL; COLLARES-PEREIRA; ELLIS, 2011; ).

**Figura 1.** Micrografia eletrônica da *Leptospira interrogans* estirpe MGA isolada em 1915 na Bélgica. (Fonte: Public Health Image Library at the Centers for Disease Control and Prevention; content provider CDC/NCID/Rob Weyant, in CAMERON, 2015).



A leptospirose é uma doença transmitida pela urina de animais infectados, sendo considerada contagiosa, desde que a bactéria causadora da doença permaneça em ambientes úmidos. As leptospiras patogênicas podem sobreviver longos períodos na água dependendo da temperatura, da salinidade, do pH e da contaminação. São bactérias sensíveis ao pH ácido abaixo de 6,8, sobrevivendo apenas em locais com pH alcalino (7,8-7,9) (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001; BHARTI et al., 2003; MIRAGLIA et al., 2013).

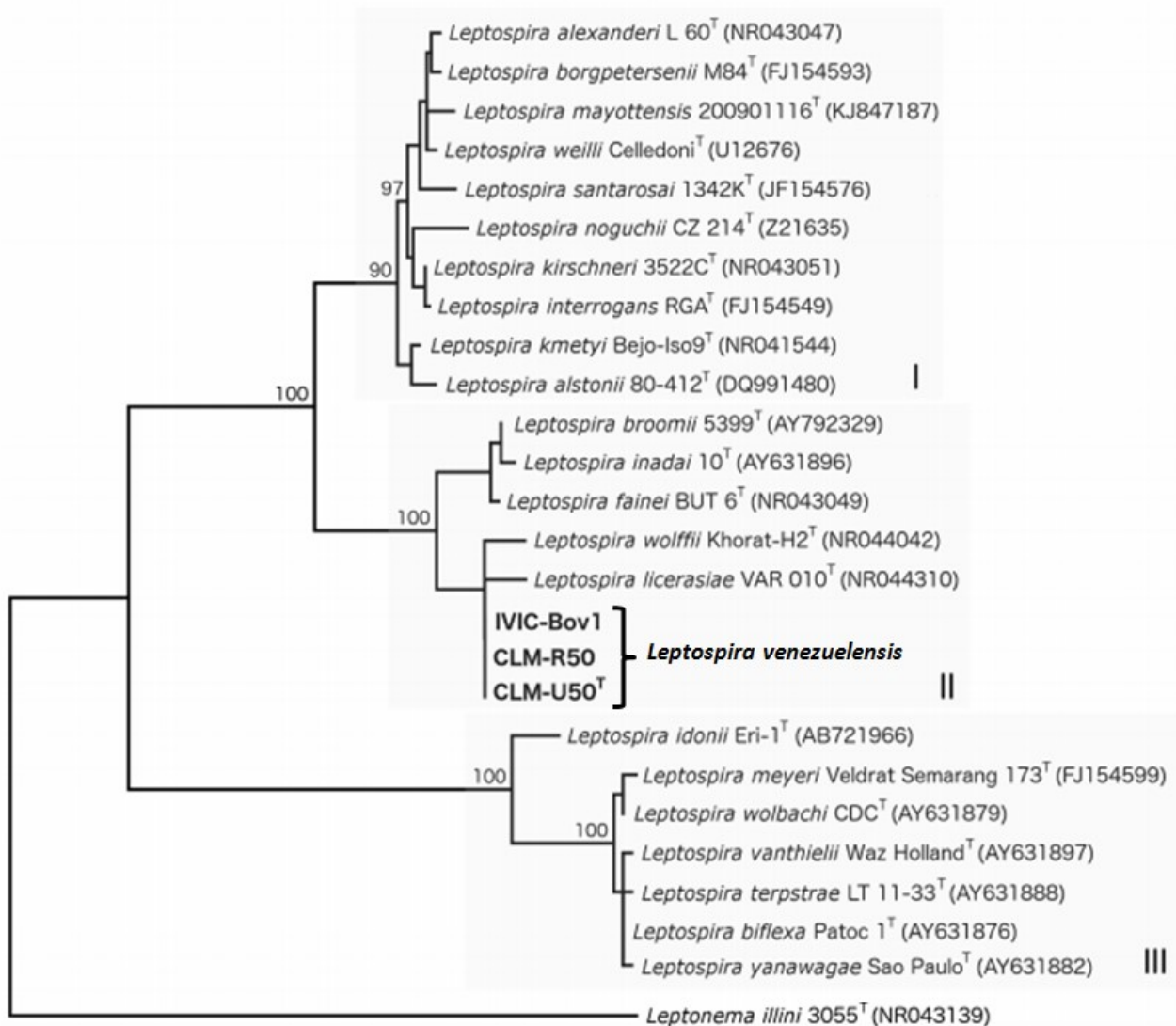
Os tipos de habitats mais escolhidos pelas leptospiras são margens de rios, valas, cachoeiras e áreas lamacentas de criação do gado, onde há uma passagem regular de animais silvestres ou mamíferos de produção pecuária (MIRAGLIA et al., 2013).

Por muitos anos a classificação das leptospiras baseou-se em sorogrupos e sorovares, através de determinantes antigênicos, sendo subdivididas em *L. interrogans* (patogênicas) e *L. biflexa* (saprófitas) (FAINE et al., 1999; PAES, 2016). A partir de 2010, também foi aceita a classificação de Adler e Moctezuma, e juntamente com estudos de outros pesquisadores, atualmente, as espécies de *Leptospira* reconhecidas, não se restringem apenas às duas espécies classificadas anteriormente (*L. interrogans* e *L. biflexa*), sendo divididas em 23 genomoespécies com mais de 300 sorovares divididas em 28 sorogrupos, classificadas como 10 espécies pertencentes ao grupo das leptospiras



patogênicas (*Leptospira alexanderi*, *Leptospira weilii*, *Leptospira borgpetersenii*, *Leptospira santarosai*, *Leptospira kmetyi*, *Leptospira alstonii*, *Leptospira interrogans*, *Leptospira kirschneri*, *Leptospira noguchii* e *Leptospira mayottensis*); seis espécies pertencentes ao grupo das leptospiros intermediárias (*Leptospira licerasiae*, *Leptospira wolffii*, *Leptospira fainei*, *Leptospira inadai*, *Leptospira broomii* e *Leptospira venezuelensis*); e sete pertencentes ao grupo das leptospiros não-patogênicas ou saprófitas (*Leptospira idonii*, *Leptospira vanthiellii*, *Leptospira biflexa*, *Leptospira wolbachii*, *Leptospira terpstrae*, *Leptospira meyeri* e *Leptospira yanagawae*), conforme Figura 2. (ADLER; MOCTEZUMA, 2010; PUCHE et al., 2018).

**Figura 2** - Espécies de *Leptospira* de acordo com a análise molecular filogenética (Fonte: PUCHE et al., 2018 – com adaptações). Legenda: Grupos filogenéticos I (leptospiros patogênicas), II (leptospiros intermediárias) e III (leptospiros saprófitas).



A estrutura da *Leptospira* é muito similar à das bactérias Gram-negativas, apresentando uma membrana externa, na qual o lipopolissacarídeo (LPS) está embutido na parte externa, uma membrana interna e um espaço periplásmico interponente contendo peptidoglicano (CAMERON, 2015).

A classificação taxonômica das leptospirosas é baseada em determinantes antigênicos e determinantes genéticos. A classificação por determinantes antigênicos baseia-se em testes sorológicos e a diferenciação entre os sorovares é determinada pela heterogeneidade da estrutura dos carboidratos do lipopolissacarídeo (LPS), os sorovares classificados antigenicamente por esse método são agrupados em sorogrupos (ADLER, 2015, LEVETT, 2015).

O que permite a diversificação antigênica das estirpes de leptospira é a variação dos carboidratos da cadeia lateral do lipopolissacarídeo (LPS) de membrana externa, onde está concentrado grande parte dos seus fatores de virulência (EVANGELISTA; COBURN, 2010).

A membrana externa da *Leptospira* também é composta por lipoproteínas e proteínas transmembranares (CAMERON, 2015). O perfil proteico da membrana externa da *Leptospira* é relativamente complexo, tendo uma maior abundância de lipoproteína *lipL32* (HAAKE et al., 2000). A predominância da *lipL32* combinado com um alto grau de conservação em leptospirosas patogênicas e intermediárias, e ausência em leptospirosas saprófitas, demonstrada na expressão *in vivo*, torna esta proteína um provável fator de virulência (MURRAY, 2013).

As espécies saprófitas são mais resistentes ao ambiente do que espécies patogênicas, pois podem sobreviver em temperaturas igual a maiores que 10°C, e apresentar um maior crescimento entre as temperaturas de 28 a 30°C. Essas bactérias, no solo e na água, além de suportarem maiores variações de temperaturas, também suportam variações de nutrientes quando relacionadas às bactérias patogênicas, uma vez que as bactérias saprófitas possuem as enzimas necessárias para utilizar ácidos graxos de cadeia curta como fonte de energia encontrados no ambiente, em contraste, as espécies patogênicas dependem da disponibilidade de ácidos graxos de cadeia longa encontrados no hospedeiro mamífero, desta forma, as espécies saprófitas possuem maior capacidade de sobreviver em diversos ambientes quando comparadas às patogênicas (JOHNSON, HARRIS e WALBY, 1969; PICARDEAU et al., 2008).

As leptospirosas entram nos hospedeiros através de lesões na pele ou mucosas, e posteriormente atingem rapidamente a corrente sanguínea e órgãos alvos. Quando a infecção ocorre por leptospirosas não-patogênicas (saprófitas), elas conseguem penetrar e entrar na corrente sanguínea do hospedeiro, porém são rapidamente destruídas e eliminadas. Já as leptospirosas patogênicas são capazes de se multiplicar na corrente sanguínea e desencadear uma resposta imune específica no hospedeiro (FAINE et al., 1999; MERI et al., 2005).

A capacidade de causar ou não doença no animal se deve à presença das imunoglobulinas leptospirais (Lig), que são moléculas expostas à superfície das espécies de leptospiros patogênicos, mas não em espécies saprófitas, as quais possuem a capacidade de inativação do sistema complemento, que é a primeira linha de defesa do organismo do hospedeiro contra microorganismos invasores. Desta forma, as bactérias saprófitas, ao contrário das leptospiros patogênicos, não possuem a capacidade de escapar da resposta imune inata do hospedeiro através da inativação do sistema complemento, sendo eliminada da corrente sanguínea imediatamente logo após a sua entrada (CASTIBLANCO-VALENCIA et al., 2012; CHOY, 2012; CASTIBLANCO-VALENCIA et al., 2016).

As leptospiros patogênicos possuem estratégias de invasão, disseminação e permanência no hospedeiro. Isto se deve a capacidade que estas bactérias possuem de aderência a células (fibroblastos, células endoteliais, monócitos e macrófagos) e a proteínas da matriz extracelular (colágeno tipo I e IV, laminina, fibronectina, elastina), além da capacidade de se proteger dos mecanismos de defesa inata do hospedeiro, sobrevivendo na circulação sanguínea devido a habilidade de inativar o sistema complemento, que representa a primeira linha de defesa imune do organismo do hospedeiro contra bactérias invasoras (MIRAGAIA, 2016). Além disso, bactérias patogênicas também possuem uma proteína (hemolisina) capaz de romper a membrana de hemácias, provocando a lise celular e liberando grandes quantidades de ferro indispensáveis para sobrevivência de algumas estirpes de *Leptospira* patogênica (WANDERSMAN et al., 2000).

O aparecimento das espécies intermediárias e patogênicas foi associado a eventos de aquisição gênica, representado por uma expansão genômica quando comparado a estirpes saprófitas e a variação gênica relacionada à diversidade de espécies patogênicas estudadas (MORENO, 2017).

Quando comparadas as espécies patogênicas e intermediárias, análises bioquímicas comparativas entre o LPS dessas bactérias apontam que a leptospira patogênica apresentam carboidratos (fucose) e lipídeos diferenciais (hidroxipalmitato), além de uma maior complexidade e peso molecular (PATRA et al., 2015).

Leptospiros intermediárias já foram isoladas de animais e humanos e podem causar uma variedade de manifestações clínicas brandas (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009). Porém estas espécies já foram associadas a casos fatais da infecção em humanos na Índia, destacando-se os roedores como hospedeiros principais (GANGADHAR et al., 2000; GANGADHAR et al., 2008).

Além disso, Ghiriboga et al. (2015) detectaram no Equador, o DNA da espécie *L. inadai* (intermediária) em paciente com sintoma febril, e também em outras espécies animais, como suínos, cães, bovinos e roedores da mesma província; e Moreno et al. (2018) também indentificaram esta espécie de *Leptospira* pertencente ao sorogrupo Lyme em roedores, a qual demonstrou alta

semelhança com a estirpe M34/99 relacionada com casos em humanos que não apresentam risco de doença severa.

### **1.3 Leptospirose Bovina: Etiologia, Transmissão, Patogenia e Controle.**

A leptospirose é uma importante doença zoonótica que afeta animais domésticos, silvestres e humanos, sendo disseminada no ambiente principalmente através da água contaminada com urina eliminada de animais infectados (reservatórios) (NDENGU et al., 2017).

É uma doença de distribuição mundial, considerada endêmica no Brasil, ocorrendo principalmente em países com climas tropicais ou subtropicais, onde a umidade e as elevadas temperaturas favorecem a sobrevivência da bactéria no ambiente (ADLER; MOCTEZUMA, 2010; FAVERO et al., 2017).

No ambiente, a persistência desta bactéria e seu elevado potencial de infecção, podem ser causados por diversos fatores, como a diversidade de sorovares e de espécies hospedeiras que podem albergá-los, a sobrevivência da *Leptospira* no ambiente sem parasitismo (através do elevado grau de umidade, proteção contra raios solares, temperaturas adequadas em torno de 20°C e pH neutro ou levemente alcalino em torno de 7,2 a 7,4), vale destacar, entretanto, que as leptospiros patogênicas não se multiplicam fora dos hospedeiros (VASCONCELLOS, 1993).

As leptospiros penetram nos hospedeiros através das mucosas ou pele lesada, ocorrendo disseminação hematogênica, caracterizando um quadro agudo septicêmico (leptospiremia) e, em seguida, localizam-se principalmente no fígado e nos rins. Leptospiros patogênicas, ao colonizarem os rins, contaminam o meio ambiente através da sua eliminação na urina, criando uma fonte de novas infecções, como é o caso de hospedeiros de manutenção cronicamente infectados que eliminam bactérias viáveis que podem ser transmitidas por contato direto com fluidos corporais infectados ou por exposição à água contaminada com urina; e de hospedeiros com infecções agudas, nos quais praticamente todos os órgãos podem ser infectados pela bactéria, localizando-se principalmente nos rins e bexiga, disseminando-se durante a micção para o ambiente, ficando exposta a novos hospedeiros, podendo infectá-los. (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001; ADLER; DE LA PEÑA, 2010).

Após o desaparecimento completo da bactéria da circulação sanguínea e sua instalação em órgãos dos animais, constitui-se a fase imune, que é caracterizada pelo surgimento de anticorpos (LEVETT, 2001; MARINHO et al., 2003). Em animais sobreviventes à fase aguda, as leptospiros persistem em sítios imunologicamente protegidos, como os túbulos renais proximais, câmara anterior do olho e trato genital (SULLIVAN, 1974).

A leptospirúria tem início de sete a 10 dias após da evolução da doença, onde nesta fase, ocorre a eliminação de enormes quantidades de leptospiras para o meio externo, principalmente nos primeiros meses de infecção, depois a eliminação diminui e cessa como um todo (ACHA; SZYFRES, 2001). A ocorrência da *Leptospira* e a duração da sua eliminação na urina são dependentes da relação sorovar-hospedeiro (SUBHARAT et al., 2011; FORNAZARI et al., 2012).

A leptospirose bovina geralmente é resultante da infecção por diversos tipos de sorovares, sendo os bovinos, hospedeiros do *Leptospira borgpetersenii* sorovar Hardjo, além de atuarem como reservatórios de outras espécies de *Leptospira*, como *L. kirschneri* e *L. interrogans* (ELLIS, 2015; WILSON-WELDER et al., 2016).

A infecção em bovinos é causada por dois grupos de estirpes de leptospiras. O primeiro grupo é formado por estirpes que geralmente causam infecções crônicas nos bovinos, sendo menos dependentes das condições ambientais, adaptadas ao hospedeiro afetado e transportadas por ele, tais como os sorovares Guaricura (*L. santarosai*), que ocorre nas Américas, e Hardjo, o qual apresenta distribuição mundial e duas estirpes diferentes geneticamente reconhecidas (*L. interrogans* sorovar tipo Hardjoprajitno e *L. borgpetersenii* sorovar tipo Hardjobovis); os quais são pertencentes ao sorogrupo Sejroe e adaptadas aos bovinos, tornando mais comum a transmissão direta entre animais desta espécie do que a transmissão indireta através da contaminação ambiental. O segundo grupo consiste em estirpes mais dependentes de práticas de gestão precárias e condições ambientais, relacionadas a uma maior transmissibilidade devido a presença de outras espécies hospedeiras e principalmente precipitação e acumulação de água superficial, causando infecções incidentais ligada a uma síndrome de leptospirose aguda e grave que geralmente ocorre em surtos, e são transportadas por animais silvestres de vida livre ou domésticos (de outras espécies), levando-os à excreção renal transitória de estirpes caracterizadas como sorovares Pomona e Icterohaemorrhagiae, (ELLIS, 2015; CORREIA; LOUREIRO; LILENBAUM., 2017; MARTINS; LILENBAUM, 2017).

Hospedeiros reservatórios, cronicamente infectados, geralmente são assintomáticos com eliminação intermitente da *Leptospira* na urina (leptospirúria), podendo infectar outros animais, incluindo humanos (WILSON-WELDER et al., 2016).

*Leptospira borgpetersenii* sorovar Hardjo (Hardjobovis, HB) é uma estirpe comum em nível mundial para bovinos, os quais são hospedeiros de manutenção deste sorovar, mas *Leptospira interrogans* sorovar Hardjo (Hardjoprajitno, HP) também ocorre em bovinos em algumas partes do mundo, sendo que ambos sorovares têm capacidade de colonização e persistência no trato genital de vacas e touros infectados, mostrando que disseminação venérea pode ser considerada um fator de transmissão da doença (ELLIS, 2015).

Evidências soroepidemiológicas mostraram que o sorovar Hardjo, pertencente à espécie *L. borgpetersenii* e ao sorogrupo Sejroe, foi predominante em bovinos no Chile em uma frequência de

81%, sendo que 40 % desses animais apresentaram títulos acima de 400, mostrando que este sorovar pertencente ao sorogrupo Sejroe é adaptado ao bovino e que altos títulos são esperados após infecções ativas (SALGADO et al., 2014).

No Brasil, Favero et al. (2017) associaram o sorogrupo Sejroe (*L. interrogans* sorovar Hardjoprajitno), mais frequente no teste sorológico, como o principal causador de problemas reprodutivos no gado leiteiro no estado de Santa Catarina, além disso, este sorovar já foi isolado no Brasil por Cosate et al. (2012), estirpe Norma, e Director et al. (2014), estirpe 2012\_OV5. Enquanto que Chideroli et al. (2016), relataram o primeiro isolamento de duas estirpes pertencentes ao sorovar Hardjobovis (*Leptospira borgpetersenii* sorogrupo Sejroe) em amostras de urina de vacas naturalmente infectadas com histórico de falhas reprodutivas (abortos e infertilidade), provenientes de pequenos rebanhos leiteiros do estado do Paraná.

Além do sorovar Hardjo (sorogrupo Sejroe) ser responsável pela doença crônica e subclínica em bovinos associada a problemas reprodutivos, outros sorovares foram relatados causando infecções incidentais em bovinos em algumas partes do mundo, tais como aqueles pertencentes aos sorogrupos Canicola, Hebdomadis, Sejroe, Pyrogenes, Autumnalis, Australis, Javanica, Tarassovi, Icterohaemorrhagiae, Grippytyphosa e Pomona; sendo que os bovinos infectados com esses três últimos sorogrupos, geralmente apresentam quadro agudo, com manifestações clínicas aparentes (VARGES, 2009, ELLIS, 2015).

Em bovinos, a leptospirose se manifesta nas formas aguda e crônica. Em animais adultos a forma aguda está relacionada com febre e mastite focal; nos bezerros, pode ocorrer febre, anorexia, hemoglobinúria, encefalite, processos convulsivos e alta mortalidade (FAINE, 1999; ELLIS, 2015).

Os bovinos geralmente exibem a infecção crônica da leptospirose, mais comum em animais adultos, tendo maior evidência em fêmeas, com poucos sinais clínicos externos, além das falhas reprodutivas. Desta forma, a doença foi estabelecida em bovinos, como uma das doenças infecciosas mais importantes, sendo bem conhecida como causa de desordens reprodutivas severas, tais como abortos, natimortos, nascimento de descendentes fracos e infertilidade, além da diminuição na produção leiteira e nas taxas de crescimento, causando perdas econômicas mundiais e em vários estados brasileiros (SALGADO et al., 2014; ELLIS, 2015; FAVERO et al., 2017; MARTINS; LILENBAUM, 2017).

São vários os impactos negativos causados pela leptospirose, principalmente relacionados à perdas econômicas, devido aos abortamentos (12 a 68,4%) em rebanhos não vacinados, ocorrência de natimortos, flacidez de úbere, diminuição da produção láctea, redução da taxa de concepção e infertilidade (47%) e elevado custo com o tratamento, levando em consideração a alta disseminação da doença às diversas espécies animais de produção (PIRES, 2010; PAIXÃO et al., 2016).

Ainda não foi estimado o custo da apresentação silenciosa da doença, que causa outros problemas reprodutivos além de abortos, porém alguns estudos sobre perdas econômicas em surtos de leptospirose bovina foram realizados na Argentina, por Draghi et al. (2011), que determinaram prejuízos de US\$ 150.000 em relação a morte de bezerros, e a vacinação e tratamento de 1.300 animais sobreviventes no período de um ano; e na França, por Ayrat (2013), que estimou o custo anual da leptospirose nos rebanhos bovinos leiteiros em de US\$ 97 a 2.611 por vaca abortada (MARTINS; LILENBAUM, 2017).

Diante das condições ambientais tropicais brasileiras favoráveis à sobrevivência da bactéria e à grande diversidade de espécies de animais silvestres que podem estar agindo como reservatórios, o controle da leptospirose bovina pode ser muito difícil, caro, desafiador e desanimador, uma vez que para realizá-lo é necessário basear-se nos diversos elos da cadeia de transmissão da doença (FAINE et al., 2000; ADLER; MOCTEZUMA, 2010). Vale destacar que a eficácia das medidas de controle estabelecidas varia de acordo com o sorovar envolvido no desenvolvimento da doença em bovinos (MARTINS; LILENBAUM, 2017).

Devido a dificuldade de evitar o contato bovino-bovino, geralmente, o controle das estirpes adaptadas a essa espécie deve basear-se principalmente em tratamentos de animais doentes com antibioticoterapia e vacinação sistemática do rebanho (MUGHINI-GRAS et al., 2014).

Outras medidas que podem auxiliar no controle da doença em bovinos é a implantação de medidas aplicadas de manejo aos animais e ao ambiente, tais como controle de roedores sinantrópicos (vias de transmissão); evitar o contato direto e indireto dos bovinos com outras espécies animais ou com outros bovinos oriundos de locais que possuem histórico sanitário desconhecido, aplicando a quarentena nesses animais; a realização de exames sorológicos periódicos; e a utilização de inseminação artificial (ADLER; MOCTEZUMA, 2010; HASHIMOTO et al., 2012).

Mughini-Gras et al. (2014) controlaram surtos de leptospirose em rebanho bovinos infectados pelo sorovar Hardjo através da vacinação e quimioprofilaxia em conjunto dos animais do rebanho, enquanto Rolim et al. (2012) adotaram medidas sanitárias para reduzir a propagação da leptospirose bovina, tais como, fornecimento de água e alimentos limpos, drenagem das áreas alagadiças e higiene das instalações e equipamentos.

A vacinação, como já foi destacada, é a medida sanitária mais importante para o controle da leptospirose bovina, pois proporciona imunidade humoral nos animais, protegendo-os contra a manifestação dos sinais clínicos da leptospirose e impedindo que a enfermidade seja transmitida entre os animais e os seres humanos (ARDUINO et al., 2009).

Entretanto, embora a proteção heteróloga entre sorovares do mesmo sorogrupo possa ocorrer, conforme demonstrado nos estudos de Cortese et al. (2014) e Dib et al. (2014), a imunidade

desenvolvida no animal pela vacinação contra leptospirose ainda é referida como sorovariedade específica (MARTINS; LILENBAUM, 2017). Desta forma, para garantir a eficiência da vacinação, deve-se fazer a identificação da variante sorológica, uma vez que a imunização protege o animal apenas contra as sorovariedades homólogas ou semelhantes antigenicamente, induzindo o animal a uma imunidade adquirida por sorovariedade específica (ARDUINO et al., 2009).

Muitas vacinas comerciais disponíveis no mundo, geralmente são compostas por cinco a dez sorovares de leptospiros inativados, formuladas a partir de estirpes de *Leptospira* internacionais de referência. Por esse motivo, as vacinas podem não ser adequadas para a proteção contra infecções causadas por estirpes autóctones (locais), especialmente em regiões tropicais, onde as estirpes locais encontradas, nem sempre estão disponíveis para desenvolvimento de vacinas ou testes de potência (MARTINS; LILENBAUM, 2017).

Desta forma, segundo Araújo et al. (2005), uma alternativa mais eficaz para controlar a leptospirose em bovinos seria o uso de vacinas elaboradas com as sorovariedades específicas prevalentes na propriedade. Tal fato, foi comprovado por Chiareli et al. (2012), que empregaram em uma vacina experimental, estirpes isoladas da urina de vacas sorologicamente positivas em uma determinada propriedade, e verificaram que o uso da vacina com as estirpes isoladas em bovinos da própria fazenda foi eficaz no controle da leptospirose do rebanho no período de dois anos, uma vez que os resultados sorológicos revelaram ausência de animais positivos na última prova realizada.

#### **1.4 Leptospirose Bovina: inquéritos sorológicos no Brasil**

No Brasil, a leptospirose é endêmica em todas as unidades federativas, de caráter sazonal, tornando-se epidêmica, principalmente, em período com elevados índices chuvosos, pela ocorrência de inundações que propiciam a disseminação da *Leptospira* no ambiente, facilitando a existência dos surtos, apresentando um elevado risco à saúde pública (FIGUEIREDO et al., 2001; CLAZER et al., 2015).

Investigações sorológicas realizadas no Brasil revelam uma alta frequência da leptospirose bovina em vários estados brasileiros variando de 6,64 a 100%, sendo Maranhão (100%), Mato Grosso do Sul (70%) e Pará (65,5%), os três estados com casos mais frequentes de leptospirose em bovino (FIGUEIREDO et al., 2009; CHIEBAO et al., 2015; PAIXÃO et al., 2016) . Além disso, vários sorovares infectando rebanhos bovinos foram detectados, principalmente os pertencentes ao sorogrupo Sejroe, como destacado no Quadro 1.



**Quadro 1.** Frequência de aglutininas anti-*Leptospira* em bovinos no teste de Soroaglutinação microscópica (MAT) em vários estados brasileiros.

| REGIÃO       | ESTADO             | FREQUÊNCIA (%) | SOROGRUPOS MAIS FREQUENTES (%)  | REFERÊNCIA                   |
|--------------|--------------------|----------------|---|------------------------------|
| Nordeste     | Pernambuco         | 47,63          | Sejroe (sorovar Hardjoprajtino -21,98); Bratislava (15,73); Castellonis (11,64)                   | OLIVEIRA et al., 2001        |
|              | Bahia              | 45,42          | Sejroe (sorovares Hardjoprajtino -14,95 e Wolffi - 3,35); Shermani (4,94)                         | OLIVEIRA et al., 2009        |
|              | Paraíba            | 61,1           | Sejroe (sorovar Hardjo - 58,17); Icterohaemorrhagiae (17,32); Australis (4,58)                    | PIMENTA et al., 2014         |
|              | Maranhão           | 100,0          | Semaranga (sorovar Patoc - 97,0); Castellonis (84,0); Sejroe (sorovar Hardjo - 83,0)              | PAIXÃO et al., 2016          |
| Norte        | Rondônia           | 52,8           | Sejroe (sorovares Hardjo - 14,5 e Wolffi - 12,3); Shermani (10,8)                                 | AGUIAR et al., 2006          |
|              | Pará               | 65,5           | Sejroe (sorovares Hardjo - 63,58 e Wolffi - 3,53); Grippotyphosa (10,41)                          | CHIEBAO et al., 2015         |
| Centro-Oeste | Goiás              | 62,2           | Sejroe (sorovares Wolffi - 14,53 e Hardjo -12,7); Grippotyphosa (10,55)                           | MARQUES et al., 2010         |
|              | Goiás              | 18,9           | Sejroe (sorovares Hardjo + Wolffi - 46,3)   | PAIM et al., 2016            |
|              | Mato Grosso do Sul | 70,0           | Sejroe (sorovares Hardjo - 65,6 e Wolffi - 12,3)  | FIGUEIREDO et al., 2009      |
|              | Mato Grosso        | 62,5           | Sejroe (Hardjo - 82,35 e Wolffi - 5,88)   | FÁVERO et al., 2001          |
| Sudeste      | Minas Gerais       | 41,3           | Sejroe (sorovares Hardjo - 59,6 e Wolffi - 13,3); Pomona (5,1)                                    | FÁVERO et al., 2001          |
|              | Minas Gerais       | Não informado  | Sejroe (sorovares Hardjoprajtino - Norma - 23,7, Hardjoprajtino - OMS - 19,7 e Hardjobovis -13,8) | ARAÚJO et al., 2005          |
|              | São Paulo          | 49,4           | Sejroe (sorovares Hardjo - 46 e Wolffi + Hardjo - 21); Shermani (8,9)                             | CASTRO et al., 2008          |
|              | Rio de Janeiro     | 46,9           | Sejroe (Hardjo - 43,8 e Wolffi - 24,7); Australis (sorovar Bratislava - 15,2)                     | LILENBAUM; SOUZA, 2003       |
|              | Rio de Janeiro     | 37             | Sejroe (62,3); Javanica (7,8); Icterohaemorrhagiae (6,5)  | HAMOND et al., 2015          |
|              | Espírito Santo     | 12,42          | Sejroe (Hardjobovis - 12,42, Hardjoprajtino - 12,42 e Wolffi - 2,42)                              | VIANA; ZANINI; MOREIRA, 2010 |
| Sul          | Paraná             | 37,70          | Sejroe (sorovar Hardjo - 55,22); Tarassovi (11,42); Grippotyphosa (3,91)                          | HASHIMOTO et al., 2015       |
|              | Rio Grande do Sul  | 38,75          | Sejroe (sorovar Hardjoprajtino - 29,12); Hebdomadis (2,21); Wolffi (1,54)                         | HERRMANN et al., 2012        |
|              | Santa Catarina     | 6,64           | Pomona (3,2); Sejroe (3,1); Icterohaemorrhagiae (0,6)   | FÁVERO et al., 2017          |

Diante dos inquéritos sorológicos da leptospirose bovina realizados em vários estados brasileiros presentes no Quadro 1, pode-se afirmar que as diferenças observadas nos resultados obtidos foram causadas por alguns fatores que influenciam na ocorrência da doença, tais como os reservatórios (domésticos, selvagens e sinantrópicos), práticas de manejo adotadas nos rebanhos, os sorovares no painel de antígenos do teste sorológico, as condições climáticas e ambientais e a oportunidade de ocorrência de infecções diretas e indiretas (ELLIS, 1994; ALVES et al., 2000).

A prevalência de leptospirose depende do agente disseminador (animal portador), do contato de indivíduos suscetíveis ao agente etiológico da doença, da contaminação e sobrevivência da *Leptospira* no ambiente, sendo considerados os fatores como umidade, temperatura elevada e pH levemente alcalino (BRASIL, 2009). A persistência de focos da doença se deve aos animais infectados, convalescentes e assintomáticos, os quais são considerados fontes contínuas de contaminação ambiental. Diversas espécies animais podem ser hospedeiras da *Leptospira*, sendo que cada sorovar desta bactéria tem diferentes níveis de adaptação. (BRASIL, 2009).

No estado de Minas Gerais, conforme Quadro 1, poucas pesquisas foram realizadas sobre levantamentos sorológicos para averiguar a situação da leptospirose bovina, além disso, há muitos anos não há atualização dos dados de frequência de bovinos sororeagentes à *Leptospira* spp., bem como os sorogrupos mais frequentes ocorridos nos rebanhos bovinos do estado.

Em 2013, a leptospirose bovina no Brasil foi considerada uma doença de notificação obrigatória mensal pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), porém ainda é pouca a fiscalização de órgãos públicos federais ou estaduais de sanidade animal para notificação desta doença, dificultando o conhecimento das infecções por *Leptospira* spp., bem como da extensão do contágio ambiental em nosso país.

### **1.5 Leptospirose Bovina: Isolamento de estirpes de *Leptospira* spp. no Brasil**

A identificação de sorovares dos isolados clínicos de *Leptospira* é de extrema importância para permitir o diagnóstico definitivo, o reconhecimento de novas espécies e sorovares, e o delineamento da epidemiologia da leptospirose, contribuindo para a detecção de mamíferos transportadores, e conseqüentemente facilitar o desenvolvimento de métodos profiláticos mais eficazes direcionados para o controle da leptospirose endêmica e epidêmica (GALLOWAY, LEVETT, 2010; MIRAGLIA et al., 2013).

Na maioria dos trabalhos publicados no Brasil, são realizados apenas inquéritos sorológicos que não incluem o isolamento para a identificação do agente, devido à dificuldade na obtenção de resultados conclusivos. No entanto, a utilização desses inquéritos não é suficiente para a

identificação e distinção das espécies de leptospiros que são encontradas em bovinos (CHIDEROLI et al., 2016).

Atualmente, há um número muito restrito de pesquisas com isolamentos de leptospiros em bovinos que tiveram êxito, porém estudos moleculares relataram uma grande variabilidade em relação às espécies e genótipos que circulam em bovinos no Brasil (PIMENTA, 2014; HAMOND et al., 2016).

O primeiro isolamento importante em bovinos no Brasil ocorreu em 1980 por Santa Rosa et al., a partir de amostras de rins de bovinos coletadas em frigoríficos. A estirpe isolada foi denominada como amostra BOV-G, e posteriormente caracterizada como *L. santarosai* sorogrupo Sejroe sorovar Guaricura.

Porém, dentre as estirpes utilizadas no teste de Soroaglutinação microscópica (MAT), o sorovar Guaricura ainda não se encontra inserido no painel de antígenos, sendo mais utilizadas estirpes de referência. Por esse motivo, nos inquéritos sorológicos realizados em vários estados brasileiros, apenas o sorovar Hardjo, pertencente ao sorogrupo Sejroe, é encontrado nos bovinos com alta frequência de aglutininas anti-*Leptospira*, conforme demonstrado no Quadro 1 em todas as regiões brasileiras.

No Brasil, em 1994, Moreira relatou o primeiro isolamento do sorovar Hardjo em Minas Gerais, confirmando definitivamente a presença deste sorovar de *L. interrogans* no rebanho nacional. Desde então, a estirpe de genótipo Hardjoprajitno, amostra Norma, vem sendo utilizada em estudos sorológicos no Brasil, detectando um maior número de animais positivos em comparação com a estirpe de referência (OMS).

Os sorovares Hardjoprajitno (estirpes Norma e de referência - OMS) e Hardjobovis (estirpe de referência) são reconhecidas como patogênicas para os bovinos, principalmente como causas de transtornos reprodutivos. Portanto Araújo et al. (2005) realizaram um estudo sorológico no Estado de Minas Gerais, inserindo essas três estirpes no teste de Soroaglutinação microscópica (MAT), e observaram que o sorovar Hardjoprajitno (estirpe Norma), isolado no Brasil, apresentou maior frequência de aglutininas anti-*Leptospira* em bovinos, quando comparado às estirpes de referência dos sorovares Hardjoprajitno e Hardjobovis, demonstrando as diferenças entre as amostras Norma e Hardjoprajitno (OMS) e a maior intensidade da estirpe Norma na população de bovinos estudada.

Desta forma, o isolamento e a utilização de estirpes locais no MAT são imprescindíveis para o aumento da sensibilidade e da especificidade do teste, já que a maioria das estirpes de referência, que compõem o painel de antígenos do MAT, são oriundas de países com clima e fauna muito distintas do Brasil (WHO, 2003). A partir do isolamento de Moreira (1994), outros pesquisadores conseguiram isolar com êxito estirpes de *Leptospira* em bovinos.

Langoni et al. (1999) isolaram quatro amostras do sorovar Hardjo, três de Pomona e oito do sorovar Wolffi de 15 fetos bovinos abortados em São Paulo. Outros isolamentos foram obtidos por Freitas et al. (2004) no Paraná, a partir da urina, por meio punção direta da bexiga, de dois bovinos naturalmente infectados destinados ao abate em frigorífico.

No estado do Paraná, Zacarias et al. (2008) relataram o isolamento duas estirpes de *Leptospira*, que foram tipificadas como sendo sorovares Canicola e Copenhageni, em 698 amostras coletas de urina de bovinos coletadas em frigorífico; enquanto, Chideroli et al. (2016) e Chideroli et al. (2017) isolaram, respectivamente, da urina de vacas naturalmente infectadas e com histórico de falhas reprodutivas, duas estirpes de *L. borgpetersenii* sorovar Hardjobovis (amostras Londrina 49 e Londrina 54) e uma de *L. interrogans* sorovar Hardjoprajitno (amostra Londrina 53).

No Rio Grande do Sul, Seixas Neto (2012) obtiveram três estirpes (BOV3, BOV14 e BOV15) de *Leptospira* patogênica devido à amplificação do gene *LipL32*, pertencentes à espécie *L. borgpetersenii*, isoladas de rins de bovinos destinados ao abate em frigoríficos de Pelotas.

Em Minas Gerais, Chiareli et al. (2012) isolaram duas estirpes de *Leptospira*, denominadas Lagoa e Bolívia, e caracterizadas como *L. interrogans*, sorogrupo Sejroe e sorovar Hardjoprajitno, a partir da urina de duas vacas com sinais sugestivos da leptospirose, como abortos e mastite com presença de sangue no leite.

No estado do Rio de Janeiro, Martins et al. (2015) caracterizaram duas estirpes isoladas da urina de vacas abatidas e obtiveram a identificação de dois sorogrupos, tais como Panama e Autumnalis, conhecidos como agentes de leptospirose incidental em bovinos; e Loureiro et al. (2016) isolaram a partir de urina e fluidos vaginais de bovinos aparentemente saudáveis abatidos sete estirpes de *Leptospira*, as quais foram caracterizadas em genomoespécies distintas no sequenciamento de *rrs* e *secY*, tais como, *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* e *L. santarosai*, sendo que das estirpes isoladas, cinco pertenciam à espécie *L. santarosai* ao sorogrupo Sejroe e apresentavam uma alto nível de homologia com a sequência das estirpes do sorovar Guaricura isoladas anteriormente no Brasil.

Outro estudo recente, de Pinto et al. (2017), demonstrou o isolamento de vários sorogrupos de *Leptospira* obtidas a partir da urina e fluido vaginal de bovinos abatidos no estado do Rio de Janeiro, tais como, Sarmin, Tarassovi, Shermani, Grippytyphosa e Sejroe pertencentes às espécies *Leptospira santarosai*, *L. alstonii* e *L. interrogans*, confirmando a tese de que bovinos sem sinais clínicos podem abrigar e eliminar uma grande diversidade de sorogrupos de *Leptospira* sp., e não apenas os sorovares do sorogrupo Sejroe.

## 1.6 Técnicas de diagnóstico para leptospirose bovina

### 1.6.1 Métodos Indiretos

Dentre os métodos indiretos de diagnóstico convencional de leptospirose estão os testes sorológicos de Ensaio de Imunoadsorção Enzimática (ELISA) ou Teste de Soroaglutinação Microscópica (MAT). Atualmente, o MAT é considerado o teste padrão-ouro para o diagnóstico da leptospirose animal (DENIPITIYA et al., 2016).

#### 1.6.1.1 Teste de Soroaglutinação Microscópica (MAT)

O método de referência para o diagnóstico da leptospirose bovina é teste de Soroaglutinação microscópica (MAT) (LEVETT, 2001; WHO, 2003). Esse teste foi desenvolvido a quase um século atrás pelo Instituto Pasteur, e atualmente, ainda continua sendo o teste de referência que consiste na avaliação, através da microscopia de campo escuro, do grau de aglutinação de culturas vivas de leptospiros colocadas na presença do soro sanguíneo do animal (FAINE et al., 1999; PICARDEAU, 2013).

O MAT é um teste indireto, o qual não detecta a presença de microorganismos, porém é capaz de detectar anticorpos contra a bactéria responsável pela infecção nos animais. Para realização deste teste é necessário um painel diversificado de antígenos vivos e um microscópio equipado com condensador de campo escuro (FAINE et al., 1999).

Para a realização contínua do MAT, é necessário proceder a manutenção da coleção de estirpes vivas utilizadas neste teste como antígenos. Para haver uma melhor sensibilidade no teste, a coleção de antígenos deve incluir estirpes representativas dos principais sorogrupos existentes na região em que os animais são encontrados e de preferência, estirpes representando todos os sorogrupos conhecidos (OIE, 2014).

No Centro Nacional de Referência de Leptospirose (Instituto Pasteur), são utilizadas 24 estirpes de *Leptospira*, incluindo estirpes não patogênicas *Leptospira biflexa* (amostra Patoc 1) que tem a particularidade de reação cruzada com vários antígenos de sorogrupos patogênicos, aos quais podem ser adicionados estirpes locais de algumas regiões (PICARDEAU, 2013).

O uso de isolados locais, em vez de estirpes de referência, pode melhorar a sensibilidade do teste, porém as estirpes de referência são necessárias, pois ajudam na interpretação dos resultados entre laboratórios (OIE, 2014).

O MAT consiste em incubar diluições em série do soro sanguíneo de animais com várias estirpes de *Leptospira*, sendo a amostra de soro considerada positiva, em uma dada diluição e para o antígeno testado, se houver em pelo menos 50% de leptospiros aglutinadas em comparação com antígeno controle sem a amostra de soro sanguíneo (PICARDEAU, 2013).

A especificidade do MAT é boa, pois os anticorpos contra outras bactérias geralmente não reagem de forma cruzada com *Leptospira*, porém, existe uma reatividade cruzada sorológica significativa entre sorovares e sorogrupos de *Leptospira*, sendo que um animal infectado com um sorovar pode ter anticorpos contra o sorovar infectante, os quais também reagem de forma cruzada com outros sorovares (geralmente em um nível mais baixo) no MAT (OIE, 2014).

Por isso, é necessário saber que as reações cruzadas são produzidas não só entre diferentes sorovares do mesmo sorogrupo, mas, no início da infecção (duas a três semanas), também pode ocorrer entre sorovares de diferentes sorogrupos (ACHA; SZYFRES, 2001). Além disso, pode haver conflitos entre os resultados sorológicos e de métodos diretos de isolamento da bactéria, uma vez que um animal sororreativo, pode não ser um portador da bactéria, devido a possibilidade de reações cruzadas entre diferentes sorovarietades no MAT, enquanto que os animais não reativos no MAT podem ser portadores de determinados sorovares de *Leptospira* (OTAKA et al., 2012; OIE, 2014).

Outras desvantagens do MAT é que este teste não realiza diagnósticos precoces da leptospirose quando o animal se encontra na fase aguda da doença, uma vez que os anticorpos começam a aparecer de 7 a 10 dias após a infecção, possibilitando a detecção da doença apenas no final da fase aguda, não sendo um teste capaz de indicar se a infecção é ativa, a menos que o título alcançado seja alto ou por meio de sorologia pareada; além de não fazer a diferenciação entre os anticorpos resultantes da infecção ou da vacinação, possibilitando o aparecimento de resultados falsos positivos e diminuindo a especificidade do teste (ELLIS, 1994; AHMED et al., 2009; ADLER; MOCTEZUMA, 2010).

Pelas desvantagens citadas, a sorologia não pode ser utilizada, em uma infecção individual ou surto, para identificar definitivamente o sorovar infectante, sendo necessário o isolamento do agente (OIE, 2014).

Mesmo não sendo uma técnica precisa, o MAT, ainda é muito utilizado como método diagnóstico em nível de rebanho, mostrando-se importante para compreender os aspectos epidemiológicos da doença, uma vez que o conhecimento do sorogrupo infectante de um determinado rebanho possibilitaria a aplicação de medidas profiláticas contra as leptospiroses endêmicas e epidêmicas (DIRECTOR, 2013).

## **1.6.2 Métodos Diretos**

### **1.6.2.1 Cultivo bacteriológico - Isolamento**

O isolamento de leptospirosas a partir de material clínico de portadores renais é importante e muito útil em estudos epidemiológicos para determinar quais sorovares estão presentes dentro de

um grupo particular de animais, uma espécie animal específica ou uma região geográfica (OIE, 2014). Além disso, a identificação dos isolados clínicos de *Leptospira* contribui para a detecção de mamíferos portadores da bactéria e permite o reconhecimento de novas espécies e sorovares (MIRAGLIA et al., 2008).

Apenas após a obtenção das estirpes leptospiras a partir de isolamentos é possível realizar a caracterização e tipificação das espécies, sorogrupos e sorovares de um rebanho ou de uma região, e desta forma, proceder a inclusão dessas estirpes em painel de antígenos utilizados nos testes sorológicos, além de produzir e utilizar vacinas homólogas específicas para os animais da região em que as estirpes de leptospiras foram isoladas, garantindo uma maior eficácia nos métodos diagnósticos e de controle da leptospirose (DIRECTOR, 2013).

A demonstração ou o isolamento de leptospiras de animais com a forma clínica aguda da doença ou em fetos provenientes de mães com infecções crônicas, geralmente ocorre em vários órgãos internos (fígado, pulmão, cérebro e rim) e fluidos corporais (sangue, leite, líquido cefalorraquidiano, torácico e peritoneal); já em animais atuantes como portadores da bactéria que apresentam a forma crônica, sem a presença de sinais clínicos, o isolamento e a demonstração das estirpes de *Leptospira* ocorrem no rim, na urina ou no trato genital (OIE, 2014).

O isolamento de *Leptospira* do cultivo de amostras determina um diagnóstico definitivo da leptospirose, no entanto, os laboratórios de diagnóstico relatam dificuldades no isolamento dessa bactéria, tanto pela sua fragilidade, como pelos custos e a complexidade do isolamento, além do prolongado período de incubação e possibilidade de contaminação das culturas devido a presença de outros microorganismos nas amostras clínicas (DONAHUE et al., 1991; ADLER; MOCTEZUMA, 2010).

De acordo com Faine et al. (1999), na tentativa de isolamento da *Leptospira*, uma grande variedade de meios líquidos com soro de coelho já foram descritos. Atualmente o meio líquido mais utilizado é o Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH), composto por ácido oleico, polisorbato, e 1% de soroalbumina bovina (BSA), conforme descrito por Ellinghausen e McCullough (1965).

Existem também os meios semi-sólidos para isolamentos, nos quais o crescimento bacteriano ocorre com uma tensão ótima de oxigênio, atingindo uma densidade máxima, formando uma anel discreto (ou disco de Dinger) logo abaixo da superfície do meio, se turvando cada vez mais a medida que se prossegue a incubação (LEVETT, 2001). Dentre os meios sólidos empregados na técnica de isolamento, o mais utilizado é o Fletcher (FLETCHER, 1928).

Devido a possibilidade de contaminação das culturas, alguns coquetéis de antibióticos podem ser utilizados a fim de inibir o crescimento de contaminantes carregados pelas amostras clínicas, adicionando-se ao meio de cultura alguns antibióticos como, 5-fluoracil, gentamicina, ácido

nalidíxico ou rimfapicina (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001; MIRAGLIA et al., 2009; OIE, 2014). As diluições seriadas e a filtração (filtro – 0,2 µm) dos meios de cultura também são considerados métodos aplicados para remoção de contaminantes e purificação das culturas contaminadas (FAINE et al., 1999; ADLER; MOCTEZUMA, 2010).

O isolamento de *Leptospira* a partir de órgãos e fluidos orgânicos tem sido melhorados a cada dia através do desenvolvimento de meios de cultura adequados, coquetéis de antibióticos e de melhores técnicas de tratamento e diluição da amostra (HERR et al., 1982; ADLER et al., 1986, ZACARIAS et al., 2008).

O isolamento, para ser bem sucedido, as amostras utilizadas de tecido, sangue ou urina devem ser frescas e inoculadas rapidamente em meio de cultura após a coleta, antes do início do processamento das amostras, os meios de cultivo devem ser tratados com antibiótico, além disso, as amostras devem ser inoculadas em pelo menos duas diluições de dez vezes, e dependendo do nível de contaminação, 5-fluoruracil ou outros agentes antimicrobianos seletivos para inibir contaminantes (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001). Logo após o processamento, as culturas devem ser incubadas a uma temperatura de 28 a 30°C e avaliadas semanalmente em microscópio com condensador de campo escuro, sendo mantidas por 13 semanas ou mais antes de serem descartadas, uma vez que o crescimento primário das leptospiras recém-cultivadas é lento (ADLER; MOCTEZUMA, 2010).

Alguns estudos de isolamento de *Leptospira* em bovinos já foram realizados no Brasil. Na maioria deles o material clínico coletado foi urina, rim e fluidos vaginais (ZACARIAS et al., 2008; SEIXAS NETO, 2012; MARTINS et al., 2015; CHIDEROLI et al., 2016; LOUREIRO et al., 2016; CHIDEROLI et al., 2017; PINTO et al., 2017).

Uma ampla variabilidade de espécies e genótipos tem sido relatados em isolamentos de estirpes oriundas de bovinos brasileiros, dentre as estirpes isoladas, a grande maioria pertence ao Sorogrupo Sejroe, principalmente as genomoespécies adaptadas aos bovinos, tais como, *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo (Hardjobovis) e *L.interrogans* sorovar Hardjo (Hardjoprajitno), portanto estas estirpes são comumente detectadas em bovinos sem sinais clínicos aparentes e são eliminadas através da urina, possibilitando a transmissão direta de bovino-bovino por contato com urina, sangue ou tecidos de animais infectados (ELLIS, 2015; PINTO et al., 2017).

Outras estirpes pertencentes ao sorogrupo Sejroe, *L. santarosai* sorovar Guaricura, de grande importância para bovinos, também foram isoladas no Brasil, por Santa Rosa et al. (1980) e Loureiro et al. (2016).



### 1.6.2.2 Diagnósticos moleculares

Os resultados do MAT forneceram dados epidemiologicamente importantes, permitindo a que fontes de infecção ou reservatórios sejam identificadas, a fim de contribuir para o conhecimento epidemiológico da leptospirose. No entanto, o MAT demonstra ser um preditor ineficiente do sorovar que provoca a infecção, pelas inúmeras desvantagens encontradas nesse teste (PEREZ; GOARANT, 2010).

Além disso, embora a detecção de *Leptospira* por cultivo de amostras clínicas seja considerado um diagnóstico definitivo para leptospirose, o crescimento fastidioso das leptospiras, a demora nos resultados e a falha no crescimento de leptospiras pela possibilidade de contaminação da cultura com outros microorganismos, torna esse método difícil de ser utilizado rotineiramente em laboratórios de diagnósticos, uma vez que há necessidade de diagnósticos mais rápidos, para a promoção do tratamento e controle da doença em animais infectados com a bactéria (DHALIWAL, 1996; ADLER; MOCTEZUMA, 2010; ELLIS, 2015).

Por esse motivo, existem vários métodos moleculares que podem ser aplicados quando a cultura convencional não consegue identificar o agente etiológico da doença (MILLAR; XU; MOORE, 2007).

Por isso, técnicas moleculares como reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento de DNA são úteis para a detecção e para estudos epidemiológicos, uma vez que estas técnicas se tornaram importantes para a definição da taxonomia do gênero *Leptospira*, podendo a leptospirose ser estudada usando ferramentas genéticas (PEREZ; GOARANT, 2010; KURILUNG et al., 2017).

Técnicas moleculares de diagnóstico, como a convencional PCR em tempo real, são reconhecidas como específicas e sensíveis para a detecção rápida de infecção durante estágios iniciais da doença, mostrando eficiência para o diagnóstico da doença antes do desenvolvimento de anticorpos ou quando os títulos ainda são baixos e o curso clínico não foi caracterizado. Além disso, estes testes não necessitam, por muitas vezes, de isolamento e cultura do organismo infectante, durante o fechamento de um resultado confirmatório. Desta forma, resultados rápidos e precisos usando técnicas de diagnóstico molecular podem substituir testes sorológicos em áreas onde a leptospirose é endêmica (MEIRA et al., 2011; PICARDEAU, 2013; HAMOND et al., 2014).

Além disso, a necessidade de diagnósticos rápidos levou ao desenvolvimento de numerosos ensaios de reação em cadeia de polimerase (PCR). Desta forma, técnicas de reação em cadeia de polimerase (PCR), estão sendo mais comumente utilizadas no diagnóstico de leptospirose em amostras clínicas, promovendo a amplificação de genes gênero-específicos, os quais apresentam altas sensibilidade e especificidade para identificação do material genético (DNA) da *Leptospira*

(HAMOND et al., 2016). No entanto, esta técnica não visa a identificação da sorovariedade da estirpe, não sendo amplamente utilizada em estudos epidemiológicos (BOURHY et al., 2013).

A técnica de PCR, quando comparada à técnica de cultivo bacteriológico, apresenta inúmeras vantagens, principalmente no que diz respeito a sua maior sensibilidade e capacidade de detectar DNA de bactérias mortas ou a contaminação da amostra, detectando como positivos, os animais que anteriormente haviam sido considerados negativos ao cultivo bacteriológico (BAL et al., 1994; AHMED et al., 2009).

Essa técnica também é bastante útil na detecção de agentes fastidiosos, microorganismos em culturas com menor tempo de incubação e partir de amostras clínicas sem a necessidade da presença de DNA purificado, não sendo necessárias culturas puras para a detecção de leptospiras, como é o caso do cultivo bacteriológico. Além disso, para a execução desta técnica, as amostras clínicas não necessitam ser recém-colhidas, podendo ser conservadas por congelamento ou fixadas em formalina-parafina (DIRECTOR, 2013).

A PCR é uma técnica utilizada para amplificação de sequências específicas de DNA, a qual é mediada por *primers*, enzima (polimerase), minerais e outros compostos, e dependente de temperatura para que ocorra a replicação *in vitro* de uma sequência específica de DNA. Para a realização desta técnica são necessários ciclos repetitivos de três reações simples de desnaturação (95°C – separação da fita dupla de DNA), anelamento (55°C - dois primers de oligonucleotídicos específicos se ligam ao molde de DNA para completá-lo) e extensão (72°C – quando a enzima sintetiza a cadeia complementar de todos os DNA moldes), cujas condições variam apenas na temperatura de incubação doença (MILLAR; XU; MOORE, 2007).

A *Leptospira* pode ser detectada por métodos moleculares (PCR) no sangue, durante a fase aguda e leptospirêmica da doença, além de outros fluidos corporais, como urina, líquido cefalorraquidiano (LCR) e humor aquoso, em alguns dias após o início dos sinais clínicos (WAGGONER; PINSKY, 2016).

Em animais infectados pela *Leptospira*, a leptospiúria pode ocorrer nos primeiros dias de infecção, antes da resposta de anticorpos dos animais aparecerem, portanto seria possível a detecção da *Leptospira* no início da infecção pela técnica de PCR, atuando como um diagnóstico precoce da leptospirose (DIRECTOR, 2013).

Muitos diagnósticos moleculares para leptospirose foram desenvolvidos incluindo a reação em cadeia de polimerase (PCR) convencional e em tempo real (rtPCR), PCR de transcrição reversa (RT-PCR) e métodos de amplificação isotérmica (WAGGONER; PINSKY, 2016). Essas técnicas se dividem em duas categorias baseadas na detecção de genes comuns para todas as espécies de *Leptospira*, como o gene 16S rRNA ou *rrs*, o gene *gyrB* e o gene *secY*, ou na detecção de genes restritos às leptospiras patogênicas, como o gene *lipL32*, o *ligA* e o *ligB*, sendo os últimos mais

efetivos em diagnósticos precoces da doença (AHMED et al., 2009; HAMOND et al., 2012b; WAGGONER; PINSKY, 2016).

O aumento do uso de PCR melhorou muito o diagnóstico precoce da leptospirose, restringe os dados disponíveis para vigilância epidemiológica, desta forma, outras ferramentas genéticas são implementadas para fornecem uma visão do genoma da cepa infectante através da dedução dos polimorfismos de sequência dos produtos de PCR de diagnóstico, obtendo informações epidemiológicas relevantes (PEREZ; GOARANT, 2010).

Dentre essas técnicas, existe o método molecular de VNTR (Variable Number of Tandem Repeats), o qual baseia-se na análise por PCR de sequências repetidas que podem ser encontradas em regiões intergênicas de algumas espécies de *Leptospira*, amplificando as regiões onde ocorrem sequências repetidas e permitindo a sua diferenciação de acordo com o tamanho do amplicon utilizado. Essa técnica foi utilizada por Majed et al. (2005) e Salaün et al. (2006) para caracterização das genomoespécies *L. interrogans* e *L. kirschneri*. Para a análise por PCR do VNTR, sete loci (VNTR 4, VNTR 7, VNTR 9, VNTR 10, VNTR 11, VNTR 19 e VNTR 23) podem ser utilizados (PAVAN et al., 2011).

Muitos trabalhos visando o uso de técnicas moleculares para detecção da *Leptospira* em bovinos foram realizados no Brasil, tais como: Hamond et al.(2016), Martins et al. (2015), Chideroli et al. (2016 e 2017) em amostras de urina; Loureiro et al. (2016) e Pinto et al. (2017) em amostras de urina e fluido vaginal; e Seixas Neto (2012) em amostras de rim. Além desses, outros estudos foram realizados com bovinos e outras espécies animais, inclusive em humanos.

## REFERÊNCIAS

ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. **Perfil da Pecuária no Brasil: Relatório Anual 2016**, 2017.

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonoses and Communicable Diseases common to man and animals**. 3ª ed., Washington: Pan American Health Organization, p.233 – 246, 2001.

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. **Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals: Bacterioses and Mycoses**. 3ª ed. Washington: Pan American Health Organization, 2003. 378p.

ADLER, B.; FAINE, S.; CHRISTOPHER, W.L.; CHAPPEL, R.J. Development of an improved selective medium for isolation of leptospire from clinical material. **Veterinary Microbiology**, v. 12, p. 377-381, 1986. DOI: [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(86\)90087-8](https://doi.org/10.1016/0378-1135(86)90087-8)

ADLER, B.; MOCTEZUMA, A.P. Leptospira and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v.140, p.287-296, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.012>

ADLER, B. **Leptospira and Leptospirosis**. 1ª ed. Austrália: Springer, 2015. 295 p.

AHMED, A.; ENGELBERTS, M. F.; BOER, K. R.; AHMED, N.; HARTSKEERL, R. A. Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic leptospira species in clinical materials. **PLoS One**, v. 4, n. 9, p. 1-8, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007093>

ALVES, C. J.; ANDRADE, J. S. L.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z. M.; AZEVEDO, S. S.; SANTOS, F. A. Avaliação dos níveis de aglutininas anti-Leptospira spp. em cães no município de Patos-PB, Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.7, n.2, p.17-21, 2000. DOI: <https://doi.org/10.4322/rbcv.2015.168>

ARAÚJO, V. E. M.; MOREIRA, E. C.; NAVEGA, L. A. B.; SILVA, J. A.; CONTRERAS, R. L. Frequência de aglutininas anti-*Leptospira interrogans* em soros sanguíneos de bovinos, em Minas Gerais, de 1980 a 2002. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 4, p. 430-435, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-09352005000400002>

ARDUINO, G. G. C.; GIRIO, R. J. S.; MAGAJEVSKI, F. S.; PEREIRA, G. T. Títulos de anticorpos aglutinantes induzidos por vacinas comerciais contra leptospirose bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 7, p.575-582, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100736X2009000700013>

AYRAL, F. La leptospirose dans les cheptels bovins laitiers en France: impact économique de l'infection. **Bulletin des GTV**, v. 69, p. 61–67, 2013.

BAL, A. E.; GRAVEKAMP, C.; HARTSKEERL, R. A.; DE MEZA-BREWSTER, J.; KORVER, H.; TERPSTRA, W. J. Detection of leptospire in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 8, p.1894–1898, 1994. PMID: 7989538.

BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICARDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; LEVETT, P. N.; GILMAN, R. H.; WILLIG, M. R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. M.. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **THE LANCET Infectious Diseases**, v.3, p.757–771, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(03\)00830-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00830-2)

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Leptospirose. **In: Guia de vigilância epidemiológica Brasília: Ministério da Saúde**, ed. 7, v. 8, p. 15, 2009.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária. **Pesquisa da Pecuária Municipal e Pesquisa trimestral do abate de animais de 2016**, 2016.

BOURHY, P.; HERRMANN STORCK C.; THEODOSE, R.; OLIVE, C.; NICOLAS, M.; HOCHEDÉZ, P.; LAMAURY, I.; ZININI, F.; BRÉMONT, S.; LANDIER, A.; CASSADOU, S.; ROSINE, J.; PICARDEAU, M. Serovar diversity of pathogenic *Leptospira* circulating in the French West Indies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 3, p. 1-10, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002114>

CAMERON, C. E. Leptospiral Structure, Physiology, and Metabolism. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 387, p. 21-41, 2015. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_3)

CASTIBLANCO-VALENCIA, M. M.; FRAGA, T. R.; SILVA, L. B.; MONARIS, D.; ABREU, P. A.; STROBEL, S.; JOZSI, M.; ISAAC, L.; BARBOSA, A. S. Leptospiral immunoglobulin-like proteins interact with human complement regulators factor H, FHL-1, FHR-1, and C4BP. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 205, p. 995–1004, 2012. DOI:

<https://doi.org/10.1093/infdis/jir875>

CASTIBLANCO-VALENCIA, M. M.; FRAGA, T. R.; BREDÁ, L. C.; VASCONCELLOS, S. A.; FIGUEIRA, C. P.; PICARDEAU, M.; WUNDER, E.; KO, A. I.; BARBOSA, A. S.; ISAAC, L. Acquisition of negative complement regulators by the saprophyte *Leptospira biflexa* expressing LigA or LigB confers enhanced survival in human serum. **Immunology Letters**, v.173, p. 61–68, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2016.03.005>

CASTRO, V., AZEVEDO, S. S., GOTTI, T. B., BATISTA, C. S. A., GENTILI, J., MORAES, Z. M., SOUZA, G. O., VASCONCELLOS, S. A., GENOVEZ, M. E. Soroprevalência da leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no estado de São Paulo, Brasil. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 75, n. 1, p. 3-11, 2008. URI: <http://producao.usp.br/handle/BDPI/2103>

CHIARELI, D.; COSATE, M. R. V.; MOREIRA, E. C.; LEITE, R. C.; LOBATO, F. C. F.; SILVA, J. A.; TEIXEIRA, J. F. B.; MARCELINO, A. P. Controle da leptospirose em bovinos de leite com vacina autógena em Santo Antônio do Monte, Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n.7, p. 633-639, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2012000700008>

CHIDEROLI, R.T.; PEREIRA, U. P.; GONÇALVES, D. D.; NAKAMURA, A. Y.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F.; FREITAS, J. C. Isolation and molecular characterization of *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo strain Hardjobovis in the urine of naturally infected cattle in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v.15, n. 1, p. 1-7, 2016. DOI:

<https://doi.org/10.4238/gmr.15018473>

CHIDEROLI, R. T.; GONÇALVES, D. D.; SUPHORONSKI, S. A.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A.; DE OLIVEIRA, A. G.; DE FREITAS, J. C.; PEREIRA, U. P. Culture Strategies for Isolation of Fastidious *Leptospira* Serovar Hardjo and Molecular Differentiation of Genotypes Hardjobovis and Hardjoprajitno. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1-8, 2017. DOI:

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02155>

CHIEBAO, D. P.; VALADAS, S. Y.; MINERVINO, A. H.; CASTRO, V.; ROMALDINI, A. H.; CALHAU, A. S.; DE SOUZA, R. A.; GENNARI, S. M.; KEID, L. B.; SOARES, R. M. Variables Associated with Infections of Cattle by *Brucella abortus*., *Leptospira* spp. and *Neospora* spp. in Amazon Region in Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 62, p. 30-36, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/tbed.12201>

CHIRIBOGA, J.; BARRAGAN, V.; ARROYO, G.; SOSA, A.; BIRDSSELL, D. N.; ESPAÑA, K.; MORA, A.; ESPÍN, E.; MEJÍA, M. E.; MORALES, M.; PINARGOTE, C.; GONZALEZ, M.; HARTSKEERL, R.; KEIM, P.; BRETAS, G.; EISENBERG, J. N. S.; TRUEBA, G. High prevalence of intermediate *Leptospira* spp. DNA in febrile humans from urban and rural Ecuador. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 12, p. 2141-2147, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2112.140659>

CHOY, H. A. Multiple activities of LigB potentiate virulence of *Leptospira interrogans*: inhibition of alternative and classical pathways of complement. **PLoS ONE**, v. 7, p. 1-8, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041566>

CLAZER, M.; RODRIGUES, G. V.; ARAÚJO, L.; LOPES, K. F. C.; ZANIOLO, M. M.; GERBASI, A. R. V.; GONÇALVES, D. D. Leptospirose e seu aspecto ocupacional - revisão de literatura. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 18, n. 3, p. 191-198, 2015. DOI: <https://doi.org/10.25110/arqvet.v18i3.2015.5541>

CORREIA, L.; LOUREIRO, A. P.; LILENBAUM, W. Effects of rainfall on incidental and host-maintained leptospiral infections in cattle in a tropical region. **The Veterinary Journal**, v. 220, p. 63-64, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.12.016>

COSATE, M. R.; BAROUNI, A. S.; MOREIRA, E. C.; VELOSO, I. F.; GOMES, M. T.; SALAS, C. E. Molecular characterization by LSSP-PCR and DNA sequencing of a pathogenic isolate of *Leptospira interrogans* from Brazil. **Zoonoses and Public Health**, v. 59, p. 379-388, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2012.01470.x>

CORTESE, V. S.; GALLO, G. F.; CLEARY, D. L.; GALVIN, J. E.; LEYH R. D. Efficacy of a flexible schedule for administration of a *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo bacterin to beef calves. **American Journal of Veterinary Research**, v. 75, p. 507-512, 2014. DOI: <https://doi.org/10.2460/ajvr.75.5.507>

DENIPITIYA , D. T. H.; CHANDRASEKHARAN, N. V.; ABEYEWICKREME, W.; HARTSKEERL, C. M.; HARTSKEERL, R. A.; JIFFREY, A. M.; HAPUGODA, M. D. Application of a real time polymerase chain reaction (PCR) assay for the early diagnosis of human leptospirosis in Sri Lanka. **Biologicals**, v. 44, p. 1-6, 2016. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2016.09.004>

DHALIWAL, G. S.; MURRAY, R. D.; DOBSON, H.; MONTGOMERY, J.; ELLIS W. A. Effect of *Leptospira interrogans* serovar hardjo infection on milk yield in endemically infected dairy herds. **Veterinary Record**, v. 139, p. 319–320, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1136/vr.139.13.319>

DIB, C. C.; GONÇALES A. P.; DE MORAIS Z. M.; DE SOUZA G. O.; MIRAGLIA F.; ABREU P. A., VASCONCELLOS S. A. Cross-protection between experimental antileptospirosis bacterins. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 1083-1088, 2014. DOI:

<https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000300042>

DIRECTOR, A. **Diagnóstico da leptospirose em ovinos por provas moleculares (PCR)**. 2013.74f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Área de Clínica e Reprodução animal) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2013.

DIRECTOR, A.; PENNA, B.; HAMOND, C.; LOUREIRO, A. P.; MARTINS, G.; MEDEIROS, M. A.; LILENBAUM, W. Isolation of *Leptospira interrogans* Hardjoprajitno from vaginal fluid of a clinically healthy ewe suggests potential for venereal transmission. **Journal of Medical Microbiology**, v. 63, p. 1234-1236, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.065466-0>

DRAGHI, M. G.; BRIHUEGA, B.; BENÍTEZ, D.; SALA, J. M.; BIOTTI G. M.; PEREYRA, M.; HOMSE, A.; GUARINIELLO, L. Leptospirosis outbreak in calves from Corrientes Province, Argentina. **Revista Argentina De Microbiologia**, v. 43, n. 1, p. 42–44, 2011. DOI:

<https://doi.org/10.1590/S0325-75412011000100009>

DONAHUE, J. M.; SMITH, B. J.; REDMON, K. J.; DONAHUE, J. K. Diagnosis and prevalence of leptospira infection in aborted and stillborn horses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.3, p.148-151, 1991. DOI: <https://doi.org/10.1177/104063879100300208>



ELLINGHAUSEN, H. C.; MC CULLOUGH, 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 Veterinary Medical Association**, v.26, p. 45–51, 1965. PMID: 14266934.

ELLIS, W.A. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.10, n.3, p.463-478, 1994. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30532-6](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30532-6)

ELLIS, W. A. Animal leptospirosis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 387, p. 99–137, 2015. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_6)

EVANGELISTA, K. V.; COBURN, J. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. **Future Microbiology**, v. 5, p. 1413–1425, 2010. DOI: <https://doi.org/10.2217/fmb.10.102>

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P.. **Leptospira and leptospirosis**. Melbourne: MediSci, 1999. 272p.

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

FIGUEIREDO, C. M. MOURÃO, A. C.; OLIVEIRA, M. A. A.; ALVES, W. R.; OOTEMAN, M. C.; CHAMONE, C. B.; KOURY, M. C. Leptospirose humana no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil: uma abordagem geográfica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 4, p. 331-338, 2001. URI: <http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v34n4/5413.pdf>.

FIGUEIREDO, A. O.; PELLEGRIN, A. O.; GONÇALVES, V. S. P.; FREITAS, E. B.; MONTEIRO, L. A. R. C.; OLIVEIRA, J. M.; OSÓRIO, A. L. A. R. Prevalência e fatores de risco para a leptospirose em bovinos de Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 5, p. 375-381, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2009000500003>

FLETCHER, W. Recent work on leptospirosis: Tsutsugamushi disease and tropical typhus in the Federated Malay States. **Transactions of the Royal Society of Tropical**, v. 21, n. 4, p. 265, 1928. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(28\)90019-X](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(28)90019-X)

FORNAZARI, F.; DA SILVA, R. C.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; BESERRA, H. E.; LUVIZOTTO, M. C.; LANGONI, H. Comparison of conventional PCR, quantitative PCR, bacteriological culture and the Warthin Starry technique to detect *Leptospira* spp. in kidney and liver samples from naturally infected sheep from Brazil. **Journal of Microbiology Methods**, v. 90, p. 321–326, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.06.005>

FREITAS, J.C.; SILVA, F.G.; OLIVEIRA, R.C.; DELBEN, A.C.B.; MÜLLER, E.; ALVES, L.A.; TELES, P.S. Isolation of *Leptospira* spp. from dogs, bovine and swine naturally infected. **Ciência Rural**, v.34, n.3, p.853-856, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782004000300030>

GALLOWAY, R. L.; LEVETT, P. N. Application and validation of PFGE for serovar identification of *Leptospira* clinical isolates. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 9, p. 1-7, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000824>

GANGADHAR, N. L.; RAJASEKHAR, M.; SMYTHE, L. D.; NORRIS, M. A.; SYMONDS, M. L.; DOHNT, M. F. Reservoir hosts of *Leptospira inadai* in India. **Revue Scientifique Et Technique**, v.19, n. 3, p. 793-799, 2000. DOI: <https://doi.org/10.20506/rst.19.3.1251>

GANGADHAR, N. L.; PRABHUDAS, K.; BHUSHAN, S.; SULTHANA, M.; BARBUDDHE, S. B.; REHAMAN, H. *Leptospira* infection in animals and humans: a potential public health risk in India. **Revue Scientifique Et Technique**, v. 27, n. 3, p. 885-892, 2008. <https://doi.org/10.20506/rst.27.3.1847>

GOMES, R. C.; FEIJÓ, G. L. D.; CHIARI, L. Nota Técnica: Evolução e Qualidade da Pecuária Brasileira. **Campo Grande: Embrapa Gado de Corte**, 2017, p. 1-4. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/documents/10180/21470602/EvolucaoQualidadePecuaria.pdf/64e8985a-5c7c-b83e-ba2d-168ffaa762ad> > Acesso em: 12 de dezembro de 2017.

HAAKE, D. A.; CHAO, G.; ZUERNER, R. L.; BARNETT, J. K.; BARNETT, D.; MAZEL, M.; MATSUNAGA, J.; LEVETT, P. N.; BOLIN, C. A. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 2276–2285, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1128/IAI.68.4.2276-2285.2000>

HAMOND, C.; MARTINS, G.; LILENBAUM, W.; MEDEIROS, M. A. PCR detection of leptospiral carriers among seronegative horses. **Veterinary Record**, v.171, n. 4, p. 105-106, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1136/vr.e5022>

HAMOND, C.; MARTINS, G.; LOUREIRO, A. P.; PESTANA, C.; FERREIRA, R. L.; MEDEIROS, M. A.; LILENBAUM, W. Urinary PCR as an increasingly useful tool for an accurate diagnosis of leptospirosis in livestock. **Veterinary Research Communications**, v. 38, p. 81–85, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11259-013-9582-x>

HAMOND, C.; MARTINS, G.; LILENBAUM, W.; PINNA, M.; MEDEIROS, M. A. Letter to the Editor: Infection by *Leptospira* spp. in Cattle in a Tropical Region, Rio de Janeiro, Brazil. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, p. 210, 2015. DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0519>

HAMOND, C.; PESTANA, C. P.; MEDEIROS, M. A.; LILENBAUM, W. Genotyping of *Leptospira* directly in urine samples of cattle demonstrates a diversity of species and strains in Brazil. **Epidemiology and Infection**, v. 16, p. 1-4, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0950268815001363>

HARTSKEERL, R. A.; COLLARES-PEREIRA, M.; ELLIS, W.A. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, p. 494–501, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03474.x>

HASHIMOTO, V. Y.; DIAS, J. A.; CHIDEROLI, R. T.; BARBARA, J. C. A.; BRUNHARO, T. B.; DUTRA, L. H.; SILVA, M. C. P.; MULLER, E. E.; FREITAS, J. C. Situação epidemiológica da leptospirose bovina no estado do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 6, p. 4341-4356, 2015. DOI: <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2015v36n6Supl2p4341>

HEER, S.; RILEY, A.E.; NESER, J.A.; ROUX, D.; DE LANGE, J.F. *Leptospira interrogans* sorovar pomona associated with abortion in cattle: isolation methods and laboratory animal histopathology. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 49, p. 57-62, 1982. PMID: 7122066.

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 do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v.13, n.1, p.131-138, 2012. DOI: <https://doi.org/10.5216/cab.v13i1.13190>

JOHNSON, R. C.; HARRIS, V. G. Differentiation of Pathogenic and Saprophytic Leptospire. **Journal of Bacteriology**, v. 94, n. 1, p. 27-31, 1967. PMID: 6027998.

KO AI.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature Reviews Microbiology**. v. 7, n. 10, p. 736-747, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2208>

KURILUNG, A.; CHANCHAITHONG, P.; LUGSOMYA, K.; NIYOMTHAM, W.; WUTHIEKANUN, V.; PRAPASARAKUL, N. Molecular detection and isolation of pathogenic *Leptospira* from asymptomatic humans, domestic animals and water sources in Nan province, a rural area of Thailand. **Research in Veterinary Science**, v. 115, p. 146–154, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.03.017>

LANGONI, H.; DE SOUZA, L. C.; DA SILVA, A. V.; LUVIZOTTO, M. C.; PAES, A. C.; LUCHEIS, S. B. Incidence of leptospiral abortion in Brazilian dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 40, n 3-4, p. 271-275, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(99\)00020-3](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(99)00020-3)

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, p. 296-326, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.14.2.296-326.2001>

LEVETT, P. N. Systematics of *Leptospiraceae*. In: ADLER, B., **Leptospira and Leptospirosis**. Springer Berlin Heidelberg: Germany. v. 387, cap. 2, p. 11-20, 2015. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_2)

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

[https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(03\)00114-0](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(03)00114-0)

LOUREIRO, A. P.; HAMOND, C.; PINTO, P.; BREMONT, S.; BOURHY, P.; LILENBAUM, W. Molecular analysis of leptospires from serogroup Sejroe obtained from asymptomatic cattle in Rio de Janeiro - Brazil reveals genetic proximity to serovar Guaricura. **Research in Veterinary Science**, v. 105, p. 249-253, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.02.012>

MARQUES, A. E.; ROCHA, W. V.; DE BRITO, W. M. E. D.; FIORAVANTI, M. C. S.; PARREIRA, I. M.; JAYME, V. D. S. Prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. e aspectos epidemiológicos da infecção em bovinos do Estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v.11, n. 3, p. 607-617, 2010. DOI: <https://doi.org/10.5216/cab.v11i3.5460>

MARINHO, M.; LANGONI, H.; OLIVEIRA, S.L.; CARREIRA, R.; SILVIA, H.V.P.; LUVIZOTO, M. C. Resposta humoral, recuperação bacteriana e lesões histológicas em camundongos geneticamente selecionados para bons e maus produtores de anticorpos e Balb/c, frente à infecção por *Leptospira interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.23, n. 1, p.5-12, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2003000100002>

MARTINS, G.; LOUREIRO, A.P.; HAMOND, C.; PINNA, M.H.; BREMONT, S.; BOURHY, P.; LILENBAUM, W. First isolation of *Leptospira noguchii* serogroups Panama and Autumnalis from cattle. **Epidemiology and Infection**, v. 143, p. 1538-1541, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0950268814002416>

MARTINS, G.; LILENBAUM, W. Control of bovine leptospirosis: Aspects for consideration in a tropical environment. **Research in Veterinary Science**, v.112, 156-160, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.03.021>

MERI, T.; MURGIA, R.; STEFANEL, P.; MERI, S.; CINCO, M. Regulation of complement activation at the C3-level by serum resistant leptospires. **Microbial Pathogenesis**, v. 39, n. 4, p. 139-147, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2005.07.003>

MILLAR, B. C.; XU, J.; MOORE, J. E. Molecular diagnostics of medically important bacterial infections. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 9, n. 1, p. 21-39, 2007. PMID: 17263144.

- MIRAGAIA, L. S. **Interação de proteínas de membrana de *Leptospira* com vitronectina humana**. 2016. 68f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.
- MOREIRA, E. C. 1994. 94f. **Avaliação de métodos para erradicação de leptospiroses em bovinos leiteiros**. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1994.
- MORENO, L. Z. **Caracterização e análise comparativa de genomas de estirpes de *Leptospira* isoladas no Brasil**. 2017. 98f. Tese (Doutorado em ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.
- MORENO, L. Z.; MIRAGLIA, F.; LOUREIRO, A. P.; KREMER, F. S.; ESLABAO, M. R.; DELLAGOSTIN, O. A.; LILENBAUM, W.; VASCONCELLOS, S. A.; HEINEMANN, M. B.; MORENO, A. M. Genomic characterisation of *Leptospira inadai* serogroup Lyme isolated from captured rat in Brazil and comparative analysis with human reference strain. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 5, p. 1-4, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/0074-02760170444>
- MUGHINI-GRAS, L.; BONFANTI, L.; NATALE, A.; COMIN, A.; FERRONATO, A.; LA GRECA, E.; PATREGNANI, T.; LUCCHESI, L.; MARANGON, S. Application of an integrated outbreak management plan for the control of leptospirosis in dairy cattle herds. **Epidemiology and Infection**, v. 142, p. 1172-1181, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0950268813001817>
- MURRAY, G. L. The lipoprotein LipL32, an enigma of leptospiral biology. **Veterinary Microbiology**, v. 162, p. 305–314, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.11.005>
- NDENGU, M.; DE GARINE-WICHATITSKY, M.; PFUKENYI, D. M.; TIVAPASI, M.; MUKAMURI, B.; MATOPE, G. Assessment of community awareness and risk perceptions of zoonotic causes of abortion in cattle at three selected livestock-wildlife interface areas of Zimbabwe. **Epidemiology and Infection**, v. 145, n. 7, p. 1304-1319, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0950268817000097>

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL (OIE). Terrestrial Manual. Leptospirosis. chap. 2.1.9., 2014. Disponível em: <[http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/a\\_00043.htm](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/a_00043.htm)> Acesso em: 25 de Fevereiro de 2018.

OLIVEIRA, A. A. F.; MOTA, R. A.; PEREIRA, G. C.; LANGONI, H.; SOUZA, M. I.; NAVEGANTES, W. A.; SA, M. E. R. Seroprevalence of bovine leptospirosis in Garanhuns municipal district, Pernambuco State, Brazil. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 68, p. 275-279, 2001. PMID: 12026062.

OLIVEIRA, F. C. S.; AZEVEDO, S. S.; PINHEIRO, S. R.; BATISTA, C. S. A.; VIEGAS, S. A. R. A.; BATISTA, C. S. A.; COELHO C. P.; MORAES, Z. M.; SOUZA, G. O.; GONÇALVES, A. P.; ALMEIDA, C. A. S.; VASCONCELLOS, S. A. Soroprevalência de leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no Estado da Bahia. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 4, p. 539-546, 2009. URI: <http://producao.usp.br/handle/BDPI/1894>

OTAKA, D. Y.; MARTINS, G.; HAMOND, C.; PENNA, B.; MEDEIROS, M. A.; LILENBAUM, W. Serology and PCR for bovine leptospirosis: herd and individual approaches. **Veterinary Record**, v. 170, p. 338, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1136/vr.100490>

PAES, A. C. Leptospirose Canina. In: MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. **Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia**. 1 ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016. cap. 34, p. 356-377.

PAIM, E. R. D. A.; CIUFFA, A. Z.; GOMES, D. O.; REZENDE, L. M.; SILVA, D. M.; PIRES, B. C.; CUCCATO, L. P.; DOS REIS, T. F. M.; LIMA, A. M. C. Leptospirosis in dairy cattle in Ipameri, state of Goiás, Brazil. **Semina Ciências Agrárias**, v. 37, p. 1937-1946, 2016. DOI: <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n4p1937>

PAIXÃO, A. P.; SANTOS, H. P.; ALVES, L. M. C.; PEREIRA, H. M.; CARVALHO, R. F. B.; COSTA FILHO, V. M.; OLIVEIRA, E. A. A.; SOARES, D. M.; BESERRA, P. A. *Leptospira* spp. em bovinos leiteiros do estado do Maranhão, Brasil: frequência, fatores de risco e mapeamento de rebanhos reagentes. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.83, p. 1-12, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/1808-1657001022014>

PATRA, K. P.; CHOUDHURY, B.; MATTHIAS, M. M.; BAGA, S.; BANDYOPADHYA, K.; VINETZ, J. M. Comparative analysis of lipopolysaccharides of pathogenic and intermediately pathogenic *Leptospira* species. **BMC Microbiology**. v. 15, p. 244, 2015. DOI:

<https://doi.org/10.1186/s12866-015-0581-7>

PEREZ, J.; GOARANT, C. Rapid *Leptospira* identification by direct sequencing of the diagnostic PCR products in New Caledonia. **BMC Microbiology**, v.10, p. 1-11, 2010. DOI:

<https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-325>

PICARDEAU, M.; BULACH, D. M.; BOUCHIER, C.; ZUERNER, R. L.; ZIDANE, N.; WILSON, P. J.; CRENO, S.; KUCZEK, E. S.; BOMMEZZADRI, S.; DAVIS, J. C.; MCGRATH, A.; JOHNSON, M. J.; BOURSAUX-EUDE, C.; SEEMANN, T.; ROUY, Z.; COPPEL, R. L.; ROOD, J. I.; LAJUS, A.; DAVIES, J. K.; MÉDIGUE, C.; ADLER, B. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. **PLoS ONE**, v. 3, p. 1-9, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001607>

PIMENTA, C. R. L. M. **Leptospirose bovina no estado da Paraíba: prevalência e fatores de risco associados à ocorrência de propriedades positivas**. 2014. 49f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Patos, 2014.

PIMENTA, C. L. R. M.; CASTRO, V.; CLEMENTINO, I. J.; ALVES, C. J.; FERNANDES, L. G.; BRASIL, A. W. L.; SANTOS, C. S. A. B.; AZEVEDO, S. S. Leptospirose bovina no Estado da Paraíba: prevalência e fatores de risco associados à ocorrência de propriedades positivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 4, p. 332-336, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2014000400006>

PINTO, P. S.; PESTANA, C.; MEDEIROS, M.A.; LILENBAUM, W. Plurality of *Leptospira* strains on slaughtered animals suggest a broader concept of adaptability of leptospires to cattle. **Acta Tropica**, v. 172, p. 156-159, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.04.032>

PIRES, A.V. **Bovincultura de corte**. Piracicaba: FEALQ, v.2, p. 971-975, chap.51, 2010.



PUCHE, R.; FERRÉS, I.; CARABALLO, L.; RANGEL, Y.; PICARDEAU, M.; TAKIFF, H.; IRAOLA, G. *Leptospira venezuelensis* sp. nov., a new member of the intermediate group isolated from rodents, cattle and humans. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, p. 513–517, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002528>

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. **Medicina Veterinária**, Recife, v.6, n.2, p.26-31, 2012. Disponível em: < [file:///C:/Users/Usuario/Downloads/620-1832-1-PB%20\(5\).pdf](file:///C:/Users/Usuario/Downloads/620-1832-1-PB%20(5).pdf) >. Acesso em: 10 de janeiro de 2018.

SALGADO, M.; OTTO, B.; SANDOVAL, E.; REINHARDT, G.; BOQVIST, S. A cross sectional observational study to estimate herd level risk factors for *Leptospira* spp. serovars in small holder dairy cattle farms in southern Chile. **BMC Veterinary Research**, v. 10, n. 126, p. 1-6, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-126>

SANTA ROSA, C. A.; SULZER, C. R.; PESTANA DE CASTRO, A. F.; YANAGUITA, R. M.; GIORGI, W. Two new leptospiral serovars in the hebdomadis group isolated from cattle in Brasil. **International Journal of Zoonoses**, v. 7, p. 158-163, 1980. PMID: 7251262.

SEIXAS NETO, A. C. P. **Isolamento de leptospiras em bovinos abatidos em frigoríficos de Pelotas/RS**. 2012. 39f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Medicina Veterinária Preventiva) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2012.

SUBHARAT, S.; WILSON, P. R.; HEUER, C.; COLLINS-EMERSON, J.M. Evaluation of a SYTO9 real-time polymerase chain reaction assay to detect and identify pathogenic *Leptospira* species in kidney tissue and urine of New Zealand farmed deer. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, p. 743–752, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1177/1040638711407892>

SULLIVAN, N.D. Leptospirosis in animals and man. **Australian Veterinary Journal**, v. 50, n.5, p. 216-223, 1974. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1974.tb02367.x>

VARGES, R. G. **Correção de fatores de manejo como ferramenta complementar ao controle de leptospirose em um rebanho bovino no estado do Rio de Janeiro, Brasil**. 2009. 92f. Tese (Doutorado em Clínica e Reprodução Animal) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2009.

VASCONCELLOS, S. A. Leptospirose animal. **In: III Encontro nacional em leptospirose**, Rio de Janeiro, p.62-65, 1993.

VIANA, K. F.; ZANINI, M. S.; MOREIRA, E. C. Frequência de anticorpos anti-*Leptospira* spp em rebanhos bovinos da bacia leiteira do Caparaó, estado do Espírito Santo. **Archives of Veterinary Science**, v.15, n.2, p.100-106, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.5380/avs.v15i2.16095>

WAGGONER, J. J.; PINSKY, B. A. Molecular diagnostics for human leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 29, p. 440–445, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000295>

WANDERSMAN, C.; STOJILJKOVIC, I. Bacterial heme sources: the role of heme, hemoprotein receptors and hemophores. **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, n. 2, p. 215-220, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00078-3](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00078-3)

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control**, Malta, p. 63–76, 2003.

WILSON-WELDER, J. H.; FRANK, A. T.; HORNSBY, R. L.; OLSEN, S. C.; ALT, D. P. Interaction of Bovine Peripheral Blood Polymorphonuclear Cells and *Leptospira* Species; Innate Responses in the Natural Bovine Reservoir Host. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 1110, p. 1-14, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01110>

ZACARIAS, F.G.S.; VASCONCELLOS, S.A.; ANZAI, E.K.; GIRALDI, N.; FREITAS, J.C.; HARTSKEERL, R. Isolation of *Leptospira* serovars Canicola and Copenhageni from cattle urine in the state of Paraná, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 744-748, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000400028>

## **CAPÍTULO II**

**Alta frequência dos sorogrupos Sejroe, Tarassovi e Hebdomadis em bovinos da região do  
Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, Minas Gerais, Brasil**

**(Capítulo em formato de artigo científico para posterior submissão)**

1 **Alta frequência dos sorogrupos Sejroe, Tarassovi e Hebdomadis em bovinos da região do**  
 2 **Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, Minas Gerais, Brasil**

3  
 4 **High frequency of the Sejroe, Tarassovi and Hebdomadis serogroups in cattle from the**  
 5 **Triângulo Mineiro and Alto Paranaíba areas, Minas Gerais, Brazil**

6  
 7 Soares, Pollyanna Mafra; Cuccato, Ligia Pinho; Macedo; Fernando Pereira; Soares, Mayara Mafra; Gomes; Dayane  
 8 Olímpia; Rezende, Laís Miguel; Silva, Danilo Mundim; Lemes, Karla Ribeiro; Ciuffa, Andreia Zago; Lima, Anna  
 9 Monteiro Correia  
 10

11 **ABSTRACT**

12 The objective of this study was to identify the frequency of anti-*Leptospira* antibodies and to evaluate the  
 13 epidemiological aspects of bovine leptospirosis in the Triângulo Mineiro and Alto Paranaíba herds. 372  
 14 blood serum samples from male and female cattle from 15 farms located in 12 municipalities in the  
 15 Triângulo Mineiro and Alto Paranaíba region were collected in slaughterhouses. The samples were submitted  
 16 to the microscopic agglutination teste (MAT), using 16 serogroups with 23 serovars of *Leptospira* spp..  
 17 Titers in the MAT ranged from 100 to 3.200, and 267/372 (71.8%) samples were reactive to titers  $\geq 100$ ,  
 18 mainly for the serogroups Sejroe, Tarassovi and Hebdomadis. However, in the titration, 178/267 (66.7%)  
 19 reactant samples had a higher frequency of titers  $\geq 200$  for serogroups Tarassovi (99/267 - 37.1%), Sejroe  
 20 (43/267 - 16.1%), Hebdomadis (15/267 - 5.6%). Among serovars belonging to serogroups with high titers in  
 21 MAT, Guaricura and Hebdomadis, are not found in the vaccines commercialized in Brazil, and the serovar  
 22 Tarassovi, is found in only two vaccines. In this way, leptospire belonging to these serovars may be present  
 23 in the environment, being transmitted between cattle or other domestic and wild species. Therefore, it is  
 24 concluded that leptospirosis in the Triângulo Mineiro and Alto Paranaíba, is present in high frequency in  
 25 cattle, being caused in the majority of the cases, by non-specific serogroups of that species or that are not  
 26 present in the national vaccines, indicating the low use or inefficiency of control measures.

27  
 28 **Keywords:** Bovine leptospirosis. Tarassovi. Hardjoprajitno. Guaricura. Hebdomadis.  
 29

30 **RESUMO**

31 O objetivo deste estudo foi identificar a frequência de anticorpos anti-*Leptospira* e avaliar os aspectos  
 32 epidemiológicos da leptospirose bovina nos rebanhos do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba. Foram  
 33 coletadas, em frigoríficos, 372 amostras de soro sanguíneo de bovinos machos e fêmeas provenientes de 15  
 34 propriedades localizadas em 12 municípios Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba. As amostras foram  
 35 submetidas ao teste de Soroaglutinação microscópica (MAT), utilizando-se 16 sorogrupos com 23  
 36 sorovarietades de *Leptospira* spp.. Os títulos no MAT variaram entre 100 e 3.200, sendo que 267/372  
 37 (71,8%) amostras foram reagentes a títulos  $\geq 100$ , principalmente para os sorogrupos Sejroe, Tarassovi e  
 38 Hebdomadis. No entanto, na titulação, 178/267 (66,7%) amostras reagentes apresentaram maior frequência  
 39 de títulos  $\geq 200$  para os sorogrupos Tarassovi (99/267 – 37,1%), Sejroe (43/267 – 16,1%), Hebdomadis  
 40 (15/267 – 5,6%). Dentre os sorovares pertencentes aos sorogrupos com altos títulos no MAT, o Guaricura e o  
 41 Hebdomadis, não são encontrados nas vacinas comercializadas no Brasil, e o sorovar Tarassovi, é encontrado  
 42 em apenas duas vacinas. Desta forma, acredita-se que as leptospiras pertencentes a estes sorovares podem  
 43 estar no ambiente sendo transmitidas entre os bovinos ou por outras espécies domésticas e silvestres.  
 44 Portanto, conclui-se que a leptospirose no Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, está presente em alta  
 45 frequência em bovinos, sendo causada na maioria dos casos, por sorogrupos não específicos dessa espécie ou  
 46 que não estão presentes nas vacinas nacionais, indicando uma ineficiência das medidas de controle.

47 **Palavras-chave:** Leptospirose bovina. Tarassovi. Hardjoprajitno. Guaricura. Hebdomadis.

## 48 INTRODUÇÃO

49 A leptospirose é uma doença infecciosa e transmissível, provocada por bactérias patogênicas do  
50 gênero *Leptospira*, sendo considerada uma antropozoonose de distribuição mundial, na qual os humanos são  
51 hospedeiros incidentais em um ciclo envolvendo animais silvestres e domésticos e roedores sinantrópicos,  
52 suscetíveis a uma ampla variedade de sorovares, (PICARDEAU, 2013; OIE, 2014; ANDERSEN-  
53 RANBERG et al., 2016).

54 Esta doença ocorre em países de climas tropical e subtropical, principalmente nos períodos de altos  
55 índices pluviométricos e solos neutros e alcalinos, uma vez que a bactéria é uma espiroqueta aeróbia  
56 obrigatória de ótimo crescimento em áreas alagadas de pH neutro a alcalino (6,8 a 7,4), e com temperatura  
57 variando entre 28 a 30°C (BHARTI et al., 2003; ADLER; MOCTEZUMA, 2010).

58 A maioria dos sorovares patogênicos do gênero *Leptospira* são encontrados em 3 espécies de maior  
59 distribuição mundial, tais como: *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, e *L. kirschneri*. Além dessas 3 espécies  
60 patogênicas, outras também estão envolvidas com casos da doença: *Leptospira noguchii*, *Leptospira*  
61 *santarosai*, *Leptospira alexanderi*, *Leptospira weilii*, *Leptospira borgpetersenii*, *Leptospira kmetyi*,  
62 *Leptospira alstonii* e *Leptospira mayottensis*. Existem mais de 300 sorovares diferentes de leptospira  
63 reconhecidos e estes estão distribuídos em 23 genomoespécies distribuídas em três grupos filogenéticos  
64 grupo I (leptospiras patogênicas), grupo II (leptospiras intermediárias) e grupo III (leptospiras saprófitas)  
65 (PUCHE et al., 2018).

66 Dentre os animais domésticos mais afetados pela doença, estão principalmente os cães, bovinos e  
67 suínos, que apresentam sinais clínicos bastante variáveis, sendo que na maioria dos casos a doença é  
68 inaparente, e associada a sorovares adaptados ao hospedeiro (ADLER; MOCTEZUMA, 2010). No Brasil,  
69 apesar da ampla variabilidade de espécies e genótipos de *Leptospira* encontrados em bovinos, os sorovares  
70 pertencentes ao sorogrupo Sejroe são os mais comuns e adaptados a esta espécie, destacando-se  
71 principalmente o sorovar Hardjo tipo Hardjobovis (*Leptospira borgpetersenii*) e o sorovar Hardjo tipo  
72 Hardjoprajitno (*Leptospira interrogans*) (HAMOND et al., 2016; PINTO et al., 2017).

73 No rebanho bovino brasileiro, a leptospirose é considerada uma das doenças mais importantes, pois  
74 está relacionada a problemas reprodutivos que afetam diretamente a produtividade dos rebanhos e trazem  
75 grandes prejuízos econômicos, não somente pelos danos reprodutivos (abortamentos), em torno de 12 a  
76 68,4%, em rebanhos não vacinados; mas também pelos natimortos; flacidez do úbere; queda na  
77 produtividade leiteira; redução na taxa de prenhez e de infertilidade em torno de 47%; gastos com assistência  
78 veterinária; medicamentos; testes laboratoriais e vacinas (FAINE et al., 1999; PIRES, 2010; HASHIMOTO  
79 et al., 2015; PAIXÃO et al., 2016).

80 A disseminação e manutenção da leptospirose em bovinos estão ligadas principalmente à presença de  
81 animais infectados ou a animais que são portadores assintomáticos, os quais eliminam a bactéria via urina,  
82 ou através de secreções cervical-vaginal, ou tecidos e secreções de abortamento através do feto ou placenta.  
83 Outros fatores, tais como a infecção simultânea de várias espécies diferentes de animais, a presença de  
84 animais selvagens, as condições climáticas favoráveis à manutenção da leptospira nas áreas rurais e manejo

85 do rebanho, também favorecem a presença de sorovares de leptospira no ambiente e expõe os bovinos ao  
86 risco de contraí-las (ELLIS, 1984; FAINE et al., 1999; HASHIMOTO et al., 2015).

87 Em Minas Gerais, Favero et al. (2001) relataram a frequência de 41,3% (1.855 de 4.487 animais  
88 avaliados) animais reagentes ao teste de Soroaglutinação Microscópica (MAT) em diversas propriedades,  
89 apresentando como sorovares mais frequentes: Hardjo (59,6%), Wolffi (13,3%), Pomona (5,1%). Estes  
90 resultados mostraram relevância da Hardjo como problema prioritário na leptospirose em bovinos em Minas  
91 Gerais. Já Araújo et al. (2005) relataram que sorovares mais frequentes analisados pelo MAT, entre os anos  
92 de 1980 a 2002, foram os sorovares Hardjo estirpe Norma (23,7%), Hardjo estirpe OMS (19,7%),  
93 Hardjobovis (13,8%) e Wolffi (13,2%) de 39.012 amostras de soros de bovinos provenientes de 398  
94 municípios deste estado.

95 Os dados relativos à frequência da leptospirose bovina e dos sorogrupos relacionados com a causa da  
96 doença no estado de Minas Gerais são escassos e desatualizados, isso torna necessário o desenvolvimento de  
97 novas pesquisas na área, uma vez que o estado de Minas Gerais detém um dos maiores rebanhos do Brasil,  
98 ocupando o segundo lugar no ranking brasileiro com aproximadamente 24,2 milhões de cabeças, sendo que a  
99 região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba contribui com aproximadamente 5,7 milhões cabeças do  
100 efetivo do rebanho bovino, segundo dados de 2013 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).

101 A quantificação dos casos de leptospirose é essencial para a verificação do problema em termos  
102 populacionais, possibilitando as caracterizações epidemiológicas, uma vez que o diagnóstico rápido e preciso  
103 é fundamental para elaboração de alternativas preventivas para o controle desta doença (MARQUES et al.,  
104 2010). Por isso, diante do grande potencial de disseminação da leptospirose entre espécies domésticas e  
105 silvestres, da grande diversidade de sorogrupos relacionados com a doença em bovinos e a escassez de dados  
106 epidemiológicos da doença em Minas Gerais, o objetivo deste trabalho foi identificar a frequência de  
107 anticorpos anti-*Leptospira* e avaliar os aspectos epidemiológicos da leptospirose nos rebanhos bovinos do  
108 Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba.

109

110

## 111 MATERIAL E MÉTODOS

112 Este trabalho foi realizado conforme os princípios éticos da experimentação animal estabelecidos  
113 pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária da  
114 Universidade Federal de Uberlândia (FAMEV/UFU) sob o número do protocolo de aprovação 018/16.

115 O rebanho de bovinos na região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba é de aproximadamente 5,7  
116 milhões de animais (BRASIL, 2013). Para a determinação do tamanho da amostra (n), admitiu-se uma  
117 prevalência esperada da doença de 41,3% (FAVERO et al., 2001), e um nível de confiança de 95% e uma  
118 variação de 5%. As fórmulas utilizadas, segundo Thrusfield (2007), foram:

$$n_{cor} = (N \times n) / (N + n)$$

$$n = \frac{1,96^2 P_{esp} (1 - P_{esp})}{d^2}$$

Nestas fórmulas:

$n_{cor}$  = tamanho da amostra examinada

$n$  = tamanho da amostra baseado em uma população infinita

$N$  = tamanho do rebanho em estudo

$P_{esp}$  = prevalência esperada

$d$  = precisão absoluta desejada

119

120 Substituição dos valores nas fórmulas:

$$n = \frac{1,96^2 \times 0,413 \times (1 - 0,413)}{0,05^2}$$

$$n = \frac{3,8416 \times 0,413 \times 0,587}{0,0025}$$

$$n = \frac{0,931}{0,0025} = 372 \text{ amostras}$$

$$n_{cor} = (5.700.000 \times 372) / (5.700.000 + 372)$$

$$n_{cor} = 2.120.400.000 / 5.700.372 = 372 \text{ amostras}$$

121

122

123 A partir dos cálculos realizados para a execução desse estudo foram coletadas aleatoriamente,  
 124 durante sete dias, 372 amostras de sangue de bovinos sem alteração no exame ante-mortem realizado antes  
 125 do abate, de diferentes idades e ambos os sexos, em dois frigoríficos situados na região do Triângulo  
 126 Mineiro. Não foram obtidas informações quanto ao manejo sanitário dos bovinos, principalmente se eles  
 127 foram ou não vacinados contra leptospirose.

128 A origem do animal, referente a cada amostra coletada, foi verificada de acordo com o cronograma  
 129 de abate do frigorífico, constatando-se que as amostras eram oriundas de 15 propriedades, localizadas em 12  
 130 municípios da região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, tais como, Uberlândia, Monte Alegre de Minas,  
 131 Ituiutaba, São Francisco de Sales, Santa Vitória, Frutal, Veríssimo, Santa Juliana, Abadia dos Dourados,  
 132 Serra do Salitre, Estrela do Sul e Patos de Minas.

133 A coleta das amostras de sangue foi realizada no momento da sangria, em tubos estéreis sem a  
 134 presença de anticoagulantes, e posteriormente foram encaminhadas para o Laboratório de Doenças  
 135 Infectocontagiosas (LADOC), da Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV), na Universidade Federal de  
 136 Uberlândia (UFU), para centrifugação e obtenção do soro sanguíneo, as alíquotas de soro obtidas foram  
 137 identificadas com o número do animal e estocadas à temperatura de -20°C até o momento do exame.

138 Para pesquisa de aglutininas anti-leptospiras nas amostras colhidas foi realizada a técnica sorológica  
 139 de Soroaglutinação microscópica (MAT), de acordo com Faine et al. (1999), através da utilização de culturas

140 vivas de 23 sorovares de *Leptospira* spp. pertencentes a 16 diferentes sorogrupos cedidas pelo Laboratório de  
141 Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal Fluminense (UFF), tais como: Australis (sorovares  
142 Australis e Bratislava), Autumnalis, Batavie (sorovares Batavie e Brasiliensis), Canicola, Ballum (sorovar  
143 Castellonis), Icterohaemorrhagiae (sorovares Copenhageni e Icterohaemorrhagiae), Cynopteri, Djasiman,  
144 Sejroe (sorovares Guaricura, Hardjobovis, Hardjoprajitno, Sejroe e Wolffi), Grippytyphosa, Hebdomadis,  
145 Javanica, Panama, Pomona, Shermani e Tarassovi. Essas culturas foram repicadas semanalmente em meio  
146 EMJH (DIFCO®, EUA), suplementadas com 10% de soro de coelho estéril, e estocadas a 30°C.

147 Para a interpretação do MAT, foram consideradas reações positivas amostras de soro diluídas a partir  
148 de 1:100, cujo campo microscópico apresentou 50% ou mais de leptospiras aglutinadas. As amostras que  
149 reagiram na diluição de 1:100 foram examinadas novamente em diluições de 1:200 até 1:3200, considerando  
150 também como reações positivas as amostras que apresentaram 50% ou mais de aglutinação no campo  
151 microscópico. Portanto, as amostras com os títulos superiores ou iguais a 100, foram consideradas positivas e  
152 utilizadas nas análises de dados deste estudo, uma vez que não havia informação sobre a vacinação dos  
153 animais, possibilitando a identificação dos bovinos expostos à *Leptospira* nos títulos iguais a 100 e a  
154 identificação de animais com a doença com títulos maiores que 100.

155 Os resultados do MAT foram analisados utilizando-se a técnica estatística descritiva por meio da  
156 distribuição das frequências relativas e absoluta; e o teste de comparações múltiplas para os animais  
157 positivos por sorogrupos e sorovares, utilizando-se o programa R 3.4.0, segundo Biase e Ferreira (2009),  
158 sendo consideradas diferentes significativamente comparações com o p valor < 0,05. Para o teste de  
159 comparações múltiplas para os animais positivos de acordo com a origem, foram avaliados apenas  
160 municípios com mais dez amostras.

161 Para o mapeamento dos sorovares de maior frequência nos municípios do Triângulo Mineiro e Alto  
162 Paranaíba empregou-se o *software* ArcGis e os dados sobre a localização geográfica de cada propriedade  
163 fornecidos pelo Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA).

164  
165

## 166 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

167 Os títulos sorológicos deste estudo variaram de 100 a 3.200, das 372 amostras avaliadas, 267/372  
168 (71,8%) foram reagentes ao MAT em títulos  $\geq 100$ , principalmente para os sorogrupos Sejroe (sorovares  
169 Hardjoprajitno, Guaricura, Sejroe e Wolffi), Tarassovi (sorovar Tarassovi), e Hebdomadis (sorovar  
170 Hebdomadis), e além destes, as amostras também reagiram em menor frequência para os sorogrupos  
171 Djasiman, Canicola, Ballum (sorovar Castellonis), Icterohaemorrhagiae (sorovar Copenhageni e  
172 Icterohaemorrhagiae), Batavie, Australis (sorovares Australis e Bratislava), Pomona, Cynopteri e Javanica,  
173 como mostram as Tabelas 1 e 2.

174 Esses resultados também foram confirmados pela análise estatística de comparação entre os  
175 sorogrupos relatados neste estudo, a qual mostrou que o número de animais reagentes para os sorogrupos  
176 Sejroe, Tarassovi e Hebdomadis apresentou diferença estatística ( $p$  valor <0,05) a todos os outros sorogrupos  
177 testados, destacando-se o sorogrupo Serjoe com maior frequência e diferente estatisticamente de todos os  
178 sorogrupos avaliados inclusive, Tarassovi e Hebdomadis, conforme Tabela 2.



179 No entanto, na titulação do MAT, 178/267 (66,7%) amostras reagentes apresentaram maior frequência  
180 de títulos  $\geq 200$  para os sorogrupos Tarassovi (98/267 – 36,7%), Sejroe (43/267 – 16,1%), Hebdomadis  
181 (15/267 – 5,6%), Canicola (11/267 – 4,1%), Icterohaemorrhagiae (9/267 – 3,4%) e Ballum (1/267 – 0,4%),  
182 conforme Tabela 3. Destacam-se os sorogrupos Tarassovi e Sejroe que foram significativamente diferentes  
183 (p valor  $<0,05$ ) dos demais, apresentando maiores frequências no teste estatístico de comparações múltiplas.

184 Vale ressaltar que os animais utilizados neste estudo, não apresentavam alterações clínicas no exame  
185 ante-mortem, portanto, apesar de muitas vezes os animais não apresentarem sinais clínicos, os bovinos com  
186 títulos de 100 e principalmente com títulos maiores que 200 podem ser considerados infectados e gera  
187 preocupação, pois além do *status* sanitário dos animais, eles podem estar representando risco para saúde  
188 pública, principalmente para os profissionais envolvidos no abate desses animais. Medidas sanitárias são  
189 imprescindíveis para o controle da leptospirose, principalmente em animais de produção que estão em  
190 contato próximo com humanos, os quais constituem uma população de risco, por serem hospedeiros  
191 incidentais em um ciclo envolvendo animais silvestres, roedores sinantrópicos e principalmente animais  
192 domésticos.

193 Segundo Bolin e Alt (1999), há uma variação dos sinais clínicos associados à leptospirose de acordo  
194 com o sorovar e o hospedeiro. Nos hospedeiros de manutenção, geralmente a leptospirose é caracterizada por  
195 baixos títulos de anticorpos, poucos sinais clínicos, discretos sinais na doença aguda e estado de portador  
196 renal prolongado, que pode ser associado com doença renal crônica. Nos hospedeiros incidentais, a  
197 leptospirose é causa de doença severa, estando associada a alta resposta sorológica de anticorpos  
198 aglutinantes, com curto estado de portador renal (FAINE, 1999).

199 Neste estudo, os sorogrupos Tarassovi, Sejroe e Hebdomadis apresentaram maior importância,  
200 destacando-se com maior frequência de altos títulos de aglutininas anti-leptospira os sorovares Tarassovi,  
201 Guaricura e Hebdomadis, pertencentes à estes sorogrupos, respectivamente.

202 O sorovar Tarassovi (sorogrupo Tarassovi) já foi isolado e é considerado um dos mais comuns  
203 associados com infecções em suínos, porém este sorovar também já foi relatado causando infecção em  
204 humanos, em bovinos, porcos monteiros e muitos outros animais silvestres (RYAN et al. 1976, VALE-  
205 GONÇALVES et al. 2014; ADLER, 2015).

206 Pellegrin et al. (1999) e Hashimoto et al. (2015) também encontraram bovinos reagentes ao sorovar  
207 Tarassovi, sendo que Pellegrin et al. (1999) atribuíram a sua presença no rebanho ao contato com animais  
208 reatores para esta sorovariedade, tais como os suínos domésticos e ferais (javalis e javaporco).

209 Segundo Deberdt e Scherer (2007), grupos de javalis asselvajados, espécie exótica no Brasil, já  
210 foram registrados em vários estados brasileiros, inclusive em Minas Gerais, causando inúmeros prejuízos  
211 principalmente em culturas agrícolas, devido a ausência de predadores naturais. Outro ponto destacado por  
212 esses autores foi o risco bastante significativo de transmissão de doenças, inclusive leptospirose, dos javalis  
213 para outras espécies animais, devido ao fato destes animais serem bastante resistentes a diversas doenças, o  
214 que faz deles possíveis reservatórios.

215 Outro sorovar com maior frequência nos bovinos deste estudo foi o Guaricura, pertencente ao  
216 sorogrupo Sejroe. O sorogrupo Sejroe, em todo mundo, bem como no Brasil é considerado o mais comum

217 em ruminantes, sendo o mais adaptado para bovinos e associado com maior predominância a animais  
218 assintomáticos (ELLIS, 2015, HAMOND et al., 2016, LOUREIRO et al., 2016; PINTO et al., 2017).

219 Fazem parte do sorogrupo Sejroe, os sorovares Guaricura, Hardjobovis, Hardjoprajitno, Sejroe e  
220 Wolffí. Dentre eles, o sorovar Guaricura merece destaque, pois é um sorovar brasileiro que foi isolado pela  
221 primeira vez no país por Santa Rosa et al. em 1980, em amostras de rim de bovinos coletados em  
222 frigoríficos, denominada de cepa BOV-G; e posteriormente isolado de urina de búfalas, no Vale do Ribeira,  
223 em São Paulo, sendo denominada de M04-98 (VASCONCELOS et al., 2001). No Rio de Janeiro, Loureiro et  
224 al. (2016) também isolaram da urina de bovinos e fluidos vaginais de bovinos, cinco estirpes pertencentes ao  
225 sorogrupo Sejroe e à espécie *L. Santarosai*, que apresentavam alto nível de homologia com a sequência das  
226 estirpes do sorovar Guaricura isoladas anteriormente no Brasil.

227 Sarmiento et al. (2012) empregaram no teste MAT, dez cepas de leptospiros autóctones isoladas em  
228 diversas espécies de animais no Brasil, aplicadas ao diagnóstico da leptospirose em rebanhos de bovinos de  
229 oito Estados Brasileiros, e detectaram o sorovar Guaricura com maior frequência nos estados de Mato  
230 Grosso, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Minas Gerais e Goiás; sendo Minas Gerais, o estado em que este  
231 sorovar apresentou-se como terceiro mais frequente, o que também foi constatado neste estudo.

232 Além do sorovar Guaricura, foi detectada com elevada frequência ao título de 100 e baixa frequência  
233 a títulos  $\geq 200$ , a presença do sorovar Hardjoprajitno também pertencente ao sorogrupo Sejroe, assim como  
234 nos estudos sorológicos de Araújo et al. (2005); Oliveira et al. (2009); Viana, Zanini e Moreira (2010),  
235 Herrmann et al. (2012) e Hashimoto et al. (2015).

236 O sorovar Hardjo tem o bovino como hospedeiro específico e de manutenção, apresentando uma  
237 distribuição quase global. A *Leptospira borgpetersenii* sorovar Hardjo (Hardjobovis) é a cepa mais frequente  
238 do sorogrupo Sejroe encontrada em bovinos, porém, a *Leptospira interrogans* sorovar Hardjo  
239 (Hardjoprajitno) também ocorre nesta espécie em menor frequência. No Brasil, a sorovariedade  
240 Hardjoprajitno, foi isolada em bovinos por Moreira (1994), Chiareli et al. (2012) e Chideroli et al. (2017),  
241 demonstrando a existência desse sorovar nos rebanhos brasileiros.

242 Castro et al. (2008) verificaram que além da presença mais frequente do sorovar Hardjo, transmitido  
243 comumente de bovino a bovino, em alguns rebanhos ou regiões poderia estar ocorrendo infecções incidentais  
244 por outros sorovares, e atribuíram a sua transmissão indireta ao contato com o meio ambiente contaminado  
245 por leptospiros de espécies silvestres ou outras espécies domésticas, principalmente em situações  
246 edafoclimáticas tropicais. Esses autores também fizeram referência a cervídeos, capivaras e outras espécies  
247 silvestres como reservatórios de *Leptospira* spp. para os rebanhos, uma vez que encontram habitat  
248 satisfatório próximo a eles.

249 Outro sorovar de maior relevância neste estudo foi o Hebdomadis, o qual também foi encontrado em  
250 bovinos do sudeste e sudoeste do Rio Grande do Sul, de acordo com Herrmann et al. (2012), os quais  
251 atribuíram a presença deste à infecções incidentais através de transmissão indireta associada ao contato com  
252 o meio ambiente contaminado por leptospiros oriundas de espécies silvestres ou de outras espécies  
253 domésticas, conforme o que foi abordado na pesquisa de Pellegrin et al. (1999), os quais relacionaram a

254 presença do sorovar *Hebdomadis* aos roedores silvestres, principalmente às capivaras que também são  
255 reservatórios de *Leptospira* sp..

256 Oliveira et al. (2009) também detectaram o sorovar *Hebdomadis* para bovinos e também associaram  
257 a presença dele a animais silvestres, como cervídeos e capivaras, chamando atenção ao envolvimento dessas  
258 espécies existentes na fauna brasileira como reservatório deste sorovar para os bovinos.

259 No Brasil, Albuquerque et al. (2017) detectaram leptospira na urina de capivaras de áreas  
260 periurbanas e rurais. As capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) são roedores selvagens que habitam áreas  
261 próximas a rios e lagoas no Brasil. Porém diante dos desequilíbrios ecológicos e das mudanças no seu habitat  
262 natural, as capivaras são encontradas em contato com animais de produção no ambiente rural e na periferia  
263 de áreas urbanas, representando riscos à saúde pública e perdas econômicas em animais de produção  
264 (MORENO et al., 2016).

265 Osava (2016) detectou uma elevada frequência (62,6%) de porcos monteiros sororreativos ao MAT e  
266 relacionaram este achado ao contato frequente desses animais com a rica fauna e microfauna do Pantanal,  
267 sendo estes expostos a muitos patógenos. Além disso, o sorovar *Hebdomadis* foi verificado como um dos  
268 mais frequentes (33,7%) e a sua presença foi relacionada a espécies silvestres, como o tatu, no qual o sorovar  
269 *Hebdomadis* já foi isolado (LINS; LOPES, 1984), e ao contato com bovinos que já mostraram alta  
270 frequência desse sorovar em testes sorológicos.

271 Os demais sorovares encontrados com menor frequência nesse estudo, já foram verificados em  
272 pesquisas anteriores e atribuídos à transmissão através de animais domésticos e silvestres. Segundo Adler  
273 (2015), grande parte das soroviedades pertencentes aos sorogrupos *Icterohaemorrhagiae*, *Canicola*,  
274 *Hebdomadis*, *Sejroe*, *Pyrogenes*, *Autumnalis*, *Australis*, *Javanica*, *Tarassovi*, e *Grippotyphosa* têm sido  
275 reportados causando infecções incidentais em bovinos em algumas partes do mundo, corroborando com  
276 alguns dados encontrados nesse estudo.

277 Fornazari et al. (2018) identificaram o DNA da leptospira encontrado na urina de gambás (*Didelphis*  
278 *albiventris*) e quatis (*Nasua nasua*), mostrando que essas espécies também podem atuar como reservatório da  
279 bactéria, eliminando-a no ambiente pela urina, representando uma provável fonte de transmissão para outras  
280 espécies. Vieira, Pinto e Lilenbaum (2018) demonstraram uma ampla disseminação da infecção de leptospira  
281 entre espécies silvestres em todos os biomas da América Latina, porém alertaram que são necessárias mais  
282 pesquisas sobre o papel de vida selvagem na epidemiologia da leptospirose e seu impacto sobre os bovinos e  
283 a saúde pública, particularmente no que se refere a detecção direta e caracterização molecular do agente.

284 Os bovinos avaliados nesta pesquisa viviam em fazendas localizadas no Cerrado Brasileiro, nas  
285 quais poderia existir a relação de animais domésticos e silvestres, os quais podem ser portadores de  
286 diferentes sorovares de *Leptospira* spp.

287 Souza et al. (2016) afirmaram que os sorovares do gênero *Leptospira* spp. não são espécies  
288 específicas em um estudo realizado em uma propriedade rural no município de Uberlândia, pois verificaram  
289 diferentes sorovares afetando diferentes espécies de animais, tais como, caninos, equinos, bovinos, ovinos e  
290 caprinos. Tal fato indica que é comum encontrar duas ou mais espécies animais que podem manifestar a  
291 doença simultaneamente na mesma região ou fazenda, devido ao contato entre essas espécies ou com uma

292 fonte de infecção comum, além da falta de padrões sanitários que contribuem para o estabelecimento de  
293 possível contaminação entre elas.

294 Também foram avaliados, nesta pesquisa, os sorovares mais frequentes detectados no teste MAT em  
295 bovinos sororreagentes, por município de origem das amostras na região do Triângulo Mineiro e Alto  
296 Paranaíba, conforme Figura 1. Na região do Triângulo Mineiro, quando avaliados individualmente cada  
297 município desta região, além dos sorovares já abordados acima, foram constatados os sorovares Sejroe e  
298 Canicola como mais frequentes em alguns municípios, tais como, Uberlândia e Monte Alegre. Já na região  
299 do Alto Paranaíba, quando houve avaliação por município, constatou-se a presença de dois outros sorovares  
300 mais frequentes, tais como, Wolffi e Bataviae, nos municípios de Santa Juliana e Estrela do Sul.

301 No caso do sorovar Bataviae, alguns autores como Santa Rosa et al. (1975) e Caldas et al. (1992)  
302 descreveram a presença desse sorovar em marsupiais (gambás) da ordem didelphimorfia. Desta forma, vale  
303 salientar a importância de estudos ecológicos para entendimento da epidemiologia da leptospirose em  
304 animais, principalmente quanto a distribuição de diferentes sorovarietades características de espécies  
305 silvestres, que podem estar presentes em espécies domésticas.

306 Nesse sentido, Gomes et al. (2017) também constataram a presença de roedores reagentes a  
307 diferentes sorovares de *Leptospira* spp., sendo três da espécie silvestre brasileira *Rhipidomys* spp., e  
308 enfatizaram que, embora este seja um roedor com hábitos arbóreos, pode carrear a leptospira pelos ambientes  
309 por onde passa, e mesmo que esta espécie de roedor não mostre sintomas, ele pode eliminar a bactéria  
310 através da urina por longo prazo, contaminando o solo e cursos de água, infectando outros animais e  
311 humanos.

312 Desta forma nota-se que a leptospirose está associada ao ambiente, uma vez que doença de  
313 ocorrência endêmica é restrita a focos naturais bem definidos, seus picos epidêmicos são relacionados a  
314 alterações desordenadas de origem antrópica do sistema ecológico, que ao avançar sobre novos ecossistemas,  
315 podem gerar grandes mudanças no ambiente natural, levando disseminação de leptospirosas em novas áreas e a  
316 novos hospedeiros, podendo atingir inclusive a população humana (MASCOLLI, 2001).

317 Para controle da leptospirose bovina, na prática veterinária, recomenda-se a vacinação sistemática do  
318 rebanho, antibioticoterapia para tratamento de animais doentes e eliminação de excesso de água do ambiente  
319 (DE NARDI, 2005). Dentre estas medidas sanitárias, destaca-se a vacinação como a mais importante, pois  
320 ela proporciona imunidade humoral aos animais, protegendo-os contra a manifestação dos sinais clínicos da  
321 leptospirose, e auxiliando no controle da doença transmitida entre os animais (ARDUINO et al., 2009).

322 As vacinas disponíveis para bovinos atualmente no mercado brasileiro caracterizam-se por serem  
323 culturas de leptospirosas inativadas acrescidas de adjuvantes e compostas pelos sorovares com maior  
324 prevalência nos estudos efetuados no país, sendo muito comum adquirir bacterinas pentavalentes,  
325 hexavalentes, com oito e com dez sorovares, incluindo principalmente os sorogrupos Pomona,  
326 Icterohaemorrhagiae (sorovares Copenhageni e Icterohaemorrhagiae), Sejroe (sorovares Hardjo e Wolffi),  
327 Canicola, Grippotyphosa, Australis (sorovares Australis e Bratislava), Pyrogenes e Tarassovi. (ARDUINO,  
328 2005; MAPA, 2014; SONADA et al., 2018).

329 Nesse contexto, chama-se a atenção para os sorovares Guaricura e Hebdomadis, que não são  
330 encontrados nas vacinas comercializadas no Brasil, e para o sorovar Tarassovi, o qual é encontrado em duas  
331 vacinas em âmbito nacional (Tabela 4), uma vez que estes sorovares podem estar no ambiente sendo  
332 transmitidos entre os bovinos ou por outras espécies domésticas e silvestres, sem ter relação com títulos  
333 vacinais, tornando os animais sensíveis a infecção por estes sorovares, e conseqüentemente, levando à  
334 presença de altos títulos de anticorpos no MAT.

335 Por não haver obrigatoriedade na vacinação contra leptospirose, os animais só são vacinados quando  
336 há perdas econômicas associadas com casos clínicos da doença, ou mediante resultados de testes  
337 diagnósticos positivos. Por isso, geralmente, animais destinados para corte no Brasil não são vacinados,  
338 portanto o uso da vacina como forma preventiva, ainda é restrito a alguns produtores; haja visto que as  
339 vacinas comercializadas no Brasil possuem sorovares com pouca importância epidemiológica para bovinos,  
340 gerando falhas na imunidade e aumento de custos desnecessários, além da interferência no diagnóstico.

341 Bolin (2003) e Chiareli et al. (2012) destacaram o diagnóstico de leptospirose realizado mediante  
342 aplicação da técnica de MAT apresenta algumas limitações, tais como, anticorpos com reações cruzadas  
343 entre alguns sorovares com base no parentesco entre eles, não permitindo a identificação do genótipo  
344 específico; os bovinos desenvolvem baixos níveis de anticorpos aglutinantes (100 a 400) em resposta à  
345 vacinação, levando a interferências no diagnóstico por títulos de anticorpos induzidos pela vacinação,  
346 gerando uma perda de consenso entre o título de anticorpos e os indicativos de infecção ativa, no qual título  
347 aglutinante superior ou igual a 100 é considerado significativo por muitos pesquisadores, devendo haver  
348 cautela e total consideração do quadro clínico e histórico de vacinação.

349 Apesar de ser indicada pela eficiência no controle da leptospirose bovina, a vacinação pode causar  
350 interferência em testes sorológicos para o diagnóstico da doença, uma vez que as vacinas anti-leptospiras são  
351 produzidas com antígenos inativados, os quais são imunógenos fracos, gerando resposta imune apenas do  
352 tipo humoral, conferindo principalmente uma proteção por anticorpos da classe IgG que atuam nos epítomos  
353 presentes no envelope externo do microrganismo, apresentando baixo título de anticorpos que persistem por  
354 um curto período de tempo (ARDUINO et al., 2009; CHIARELI et al., 2012).

355 Neste estudo não foi possível avaliar se os animais eram vacinados ou não contra leptospirose, uma  
356 vez que as coletas foram realizadas em frigoríficos e não se pôde verificar o histórico do controle sanitário  
357 durante a criação desses animais. Contudo, diante da alta frequência de bovinos reagentes com alto título de  
358 anticorpos para alguns sorovares não encontrados na vacina, acredita-se que a resposta humoral dos bovinos,  
359 nessa pesquisa, pode estar relacionada ao processo infeccioso do animal causado pelo agente bacteriano  
360 disseminado no ambiente.

361 Quanto ao sorovar Hardjoprajitno, um dos mais encontrados nos bovinos reagentes no teste MAT no  
362 título de 1:100, apresentou menor frequência de animais reagentes com altos títulos de anticorpos e alta  
363 frequência de animais reagentes ao título de 100 (Tabela 3), acredita-se que este sorovar pode estar  
364 desempenhando resposta imunológica no animal através de reação cruzada com outros sorovares que  
365 também estão infectando o animal ou que estão promovendo a reação vacinal. Contudo, apesar de todas as  
366 vacinas comercializadas no mercado conterem o sorovar Hardjo na sua formulação, apenas alguns

367 laboratórios informam se a cepa utilizada é referente ao sorovar Hardjobovis ou ao Hardjoprajitno, uma vez  
368 são de espécies diferentes, mas por apresentarem o mesmo sorogrupo, podem induzir ocorrência de  
369 reatividade cruzada.

370 Para Tabata et al. (2002) e Chiarelli et al. (2012) reações cruzadas podem ocorrer entre sorovares de  
371 um mesmo sorogrupo, as quais ocorrem quando um animal infectado com um sorovar, provavelmente vai ter  
372 anticorpos contra o sorovar infectante e reagir cruzadamente com outro sorovar do mesmo sorogrupo ou com  
373 características antigênicas similares; ou com uma reativação da resposta imune direcionada a sorovares que  
374 não estejam presentes na vacina; impossibilitando o diagnóstico preciso referente ao agente infectante no  
375 teste MAT.

376 A reatividade cruzada ocorre principalmente com os sorovares Hardjo e Wolffí conforme observado  
377 por Nardi Júnior et al. (2003) quando trabalharam com uma vacina que não continha o sorovar Wolffí em sua  
378 composição. Tabata et al. (2002) também confirmaram essa descrição quando trabalharam determinando a  
379 proteção cruzada entre os sorovares Wolffí, Hardjo e Guaricura em hamsters (*Mesocricetus auratus*).

380 Devido à natureza restrita dos sorovares presentes na vacina e a potencial presença de sorovares  
381 locais diferentes daqueles contidos na sua formulação, vacinas comerciais são apenas parcialmente efetivas  
382 (ADLER; MOCTEZUMA, 2010). Para uma maior eficiência da vacinação, é importante que haja a  
383 identificação da variante sorológica, haja visto que a imunidade adquirida é sorovariabilidade específica,  
384 portanto a vacinação protege apenas contra os sorovares homólogos ou semelhantes antigenicamente  
385 (ARDUINO et al., 2009).

386 Desta forma, estudos como estes de inquéritos sorológicos da leptospirose bovina, e até mesmo  
387 isolamentos, tornam-se necessários para determinar a ocorrência de novos sorovares, que podem ser  
388 provenientes de espécies silvestres, proporcionando o conhecimento da situação local, com a finalidade de  
389 desenvolver testes diagnósticos e vacinas mais específicas e com maior eficácia, promovendo um melhor  
390 controle da doença.

391

## 392 CONCLUSÃO

393 Na região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, a leptospirose está presente em alta frequência em  
394 bovinos causada por sorogrupos não específicos dessa espécie, indicando a baixa utilização ou ineficiência  
395 das medidas de controle. Além disso, alerta-se para o risco de saúde pública, principalmente para os  
396 trabalhadores rurais e magarifes que estão em contato direto com esses animais.

397

## 398 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

399 ADLER, B.; MOCTEZUMA, A.P. Leptospira and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v.140, p.287-  
400 296, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.012>

401

402 ADLER, B. **Current Topics in Microbiology and Immunology: Leptospira and Leptospirosis**. Springer  
403 Berlin Heidelberg: Germany. v. 387. 2015. 295p.

- 404 ALBUQUERQUE, N.F., MARTINS, G., MEDEIROS, L., LILENBAUM, W., RIBEIRO, V.M. The role of  
405 capybaras as carriers of leptospirosis in periurban and rural areas in the western Amazon. **Acta Tropica**, v.  
406 169, p. 57–61, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.01.018>  
407
- 408 ANDERSEN-RANBERG, E.U.; JENSEN, P.M.; PIPPER, C. Global patterns of leptospira prevalence in  
409 vertebrate reservoir hosts. **Journal of Wildlife Diseases**, v.52, p.3, p.1-10, 2016. DOI:  
410 <https://doi.org/10.7589/2014-10-245>  
411
- 412 ARDUINO, G. G. C. **Títulos de anticorpos aglutinantes induzidos por vacinas comerciais contra**  
413 **leptospirose bovina**. 2005. 115 f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias e Veterinárias) – Faculdade de  
414 Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005. URI: <  
415 <http://www.scielo.br/pdf/pvb/v29n7/13.pdf> > Acesso em: 03 de março de 2018.  
416
- 417 ARDUINO, G.G.C.; GIRIO, R.J.S.; MAGAJEVSKI, F.S.; PEREIRA, G.T. Títulos de anticorpos  
418 aglutinantes induzidos por vacinas comerciais contra leptospirose bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**,  
419 v. 29, n. 7, p.575-582, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2009000700013>  
420
- 421 ARAÚJO, V. E. M.; NAVEDA, L. A. B.; SILVA, J. A.; CONTRERAS, R. L. Frequência de aglutininas  
422 anti-*Leptospira interrogans* em soros sanguíneos de bovinos, em Minas Gerais, de 1980 a 2002. **Arquivo**  
423 **Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 4, p. 430-435, 2005. DOI:  
424 <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352005000400002>  
425
- 426 BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICARDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.;  
427 LEVETT, P. N.; GILMAN, R. H.; WILLIG, M. R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. M.. Leptospirosis: a  
428 zoonotic disease of global importance. **THE LANCET Infectious Diseases**.v.3, p.757–771, 2003. DOI:  
429 [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(03\)00830-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00830-2)  
430
- 431 BIASE, N. G.; FERREIRA, D. F. Comparações múltiplas e testes simultâneas para parâmetros binomiais de  
432 k populações independentes. **Revista Brasileira de Biometria**, v.27, n.3, p.301-323, 2009.  
433
- 434 BOLIN, C.A.; ALT, D.P. Clinical signs, diagnosis, and prevention of bovine leptospirosis. **Bovine Practice**,  
435 v.33, n.1, p. 50-55, 1999.  
436
- 437 BOLIN, C. A. Diagnosis and control of bovine leptospirosis. In: WESTERN DAIRY MANAGEMENT  
438 CONFERENCE, 6., 2003, Reno. **Proceedings...** Reno, 2003. p. 155-160. URI:  
439 <http://wdmc.org/2003/Diagnosis%20and%20Control%20of%20Bovine%20Leptospirosis.pdf>  
440  
441

- 442 BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Produção da Pecuária Municipal**, Rio de  
443 Janeiro, v. 41, p.1-108, 2013. Disponível em:  
444 <[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Pecuaria/Producao\\_da\\_Pecuaria\\_Municipal/2013/ppm2013.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2013/ppm2013.pdf)> Acesso  
445 em: 02 de dezembro de 2017.  
446
- 447 CALDAS, E. M.; FEHRINGER, W. T.; SAMPAIO, M. B. Aglutininas anti-leptospira em *Rattus norvegicus*  
448 e *Didelphis marsupialis*, em Salvador-BA. **Arquivos da Escola de Medicina Veterinária - UFBA**, v. 15, n.  
449 1, p. 43-50, 1992.  
450
- 451 CASTRO, V.; AZEVEDO, S.S.; GOTTI, T.B.; BATISTA, C.S.A.; GENTILI, J.; MORAIS, Z.M.; SOUZA,  
452 G.O.; VASCONCELLOS, S.A.; GENOVEZ, M.E. Soroprevalência da leptospirose em fêmeas bovinas em  
453 idade reprodutiva no Estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.75, n.1, p.3- 11, 2008.  
454 URI: <http://producao.usp.br/handle/BDPI/2103>  
455
- 456 CHIARELI, D.; COSATE, M.R.V.; MOREIRA, E.C.; LEITE, R.C.; LOBATO, F.C.F.; SILVA, J.A.;  
457 TEIXEIRA, J.F.B.; MARCELINO, A. P. Controle da leptospirose em bovinos de leite com vacina autógena  
458 em Santo Antônio do Monte, Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, p.633-639, 2012. DOI:  
459 <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2012000700008>  
460
- 461 CHIDEROLI, R. T.; GONÇALVES, D. D.; SUPHORONSKI, S. A.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A.; DE  
462 OLIVEIRA, A. G.; DE FREITAS, J. C.; PEREIRA, U. P. Culture Strategies for Isolation of Fastidious  
463 *Leptospira* Serovar Hardjo and Molecular Differentiation of Genotypes Hardjobovis and Hardjoprajitno.  
464 **Frontiers in Microbiology**. v. 8, p. 1-8, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02155>  
465
- 466 DEBERDT, A. J.; SCHERER, S.. O javali asselvajado: ocorrência e manejo da espécie no Brasil. **Natureza**  
467 **e Conservação**, v. 5, n. 2, p. 31-44, 2007.  
468
- 469 DE NARDI, G. **Perfil sorológico de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em búfalas (*Bubalus bubalis*)**  
470 **vacinadas com tipos de vacinas comerciais anti-leptospirose (Bacterina e Membrana externa)**. 2005.  
471 178 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de  
472 Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.  
473
- 474 ELLIS, W. A. Bovine leptospirosis in the tropics: prevalence, pathogenesis and control. **Preventive**  
475 **Veterinary Medicine**, v. 2, n.1-4, p. 411-421, 1984. DOI: [https://doi.org/10.1016/0167-5877\(84\)90085-0](https://doi.org/10.1016/0167-5877(84)90085-0)  
476
- 477 ELLIS, W.A. Leptospirosis in pig. **Pig Veterinary Journal**, v.28, p.24-34, 1992.  
478



- 479 FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. **Leptospira and leptospirosis**. Melbourne: MediSci,  
480 1999. 272p.  
481
- 482 FAVERO, A. C. M.; PINHEIRO, S. R.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z. M.; FERREIRA, F.;  
483 FERREIRA NETO, J. S. Leptospirose bovina: variantes sorológicas predominantes em colheitas efetuadas  
484 no período de 1984 a 1997 em rebanhos de 21 estados do Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 68, n.  
485 2, p. 29-35, 2001.  
486
- 487 FORNAZAR, I F., LANGONI, H., MARSON, P.M., NÓBREGA, D.B., TEIXEIRA, C.R.. Leptospira  
488 reservoirs among wildlife in Brazil: Beyond rodents. **Acta Tropica**, v. 178, p. 205-212, 2018. DOI:  
489 <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.11.019>  
490
- 491 GOMES, D. O.; RAMOS, G. B.; ALVES, V. B. A.; CIUFFA, A. Z.; CUCCATO, L. P.; DOS REIS, T. F.  
492 M.; LIMA, A. M. C.; GONÇALVES, M. C.; TOLESANO, G. V., RODRIGUES, V. S.; SZABÓ, M. P. J.  
493 Occurrence of anti-*Leptospira* spp. antibodies in *Rhipidomys* spp. from a forest fragment of the Brazilian  
494 Cerrado. **Tropical Animal Health and Production**. v. 49, n. 3, p. 555-559, 2017. DOI:  
495 <https://doi.org/10.1007/s11250-017-1227-6>  
496
- 497 HAMOND, C.; PESTANA, C.P.; MEDEIROS, M.A.; LILENBAUM, W. Genotyping of *Leptospira* directly  
498 in urine samples of cattle demonstrates a diversity of species and strains in Brazil. **Epidemiology &**  
499 **Infection**, v. 144, p. 72-75, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0950268815001363>  
500
- 501 HASHIMOTO, V. Y.; DIAS, J. A.; CHIDEROLI, R. T.; BARBARA, J. C. A.; BRUNHARO, T. B.;  
502 DUTRA, L. H.; SILVA, M. C. P.; MULLER, E. E.; DE FREITAS, J. C.. Situação epidemiológica da  
503 leptospirose bovina no estado do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 6, p. 4341-4356, 2015. DOI:  
504 <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2015v36n6Supl2p4341>  
505
- 506 HERRMANN, G. P.; RODRIGUES, R. O.; MACHADO, G.; LAGE, A. P.; MOREIRA, E. C.; LEITE, R. C..  
507 Soroprevalência de leptospirose em bovinos nas mesorregiões sudeste e sudoeste do estado Rio Grande do  
508 Sul, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**. v. 13, n. 1, p. 131-138, 2012. DOI:  
509 <https://doi.org/10.5216/cab.v13i1.13190>  
510
- 511 LINS, Z.C.; LOPES, M.L. Isolation of *Leptospira* from wild forest animals in Amazonian Brazil.  
512 **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, p. 124-126, 1984. PMID:  
513 6710564  
514  
515  
516

- 517 MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – BRASIL. Relação de Produtos de Uso  
518 Veterinário Licenciados; 2014. Disponível em: < [http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-  
520 tecnicas/ProdutosVigentesAbril2014.pdf](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/produtos-veterinarios/arquivos-comunicacoes-e-instrucoes-<br/>519 tecnicas/ProdutosVigentesAbril2014.pdf)> Acesso em: 28/02/18.  
521
- 522 MARQUES, A. E.; ROCHA, W. V.; DE BRITO, W. M. E. D.; FIORAVANTI, M. C. S.; PARREIRA, I. M.;  
523 JAYME, V. S.. Prevalência de anticorpos anti-*leptospira* spp. e aspectos epidemiológicos da infecção em  
524 bovinos do estado de Goiás. **Ciência animal brasileira**. v. 11, n. 3, p. 607-617 , 2010.  
525 DOI: <https://doi.org/10.5216/cab.v11i3.5460>  
526
- 527 MASCOLLI, R. **Inquérito sorológico para leptospirose, doença de Lyme e leishmaniose em cães do**  
528 **município de Santana de Parnaíba, São Paulo. Colheitas efetuadas durante a campanha de vacinação**  
529 **anti-rábica, no ano de 1999.** 2001. 140 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e  
530 Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São  
531 Paulo, 2001.  
532
- 533 MOREIRA, E.C.. **Avaliação de métodos para erradicação de leptospiroses em bovinos leiteiros. Minas**  
534 **Gerais, Brasil.** 1994. 94 f. Tese de Doutorado(Medicina Veterinária Preventiva), Escola de Veterinária,  
535 Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 1994.  
536
- 537 MORENO, L. Z.; MIRAGLIA, F., MARVULO, M. F. V.; SILVA, J. C. R.; PAULA, C. D.; COSTA, B. L.  
538 P.; MORAIS, Z. M.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S.; DELLAGOSTIN, O. A.; HARTSKEERL, R.  
539 A.; VASCONCELLOS, S. A.; MORENO, A. M. Characterization of *Leptospira santarosai* Serogroup  
540 Grippytyphosa Serovar Bananal Isolated from Capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) in Brazil. **Journal of**  
541 **Wildlife Diseases**, v. 52, n. 3, p. 688-693, 2016. DOI: <https://doi.org/10.7589/2015-09-245>  
542
- 543 NARDI JÚNIOR, G.; GENOVEZ, M.E.; RIBEIRO, M.G.; JORGE, A.M.; CASTRO, V.; CARREIRA, R.C.  
544 2003. Níveis de aglutininas anti-leptospira no soro de búfalas (*Bubalus bubalis*) vacinadas com dois tipos de  
545 vacinas comerciais anti-leptospirose: resultados parciais. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 70, p. 1-4,  
546 2003.  
547
- 548 OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE), 2014. **Leptospirosis**. Chapter 2.1.9. Manual of  
549 diagnosis tests and vaccines (Terrestrial Manual) . Disponível em: <  
550 [http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health\\_standards/tahm/2.01\\_09\\_LEPTO.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.01_09_LEPTO.pdf)> Acesso em: 10 de abril  
551 de 2017.  
552  
553  
554

- 555 OLIVEIRA, F. C. S.; AZEVEDO, S. S.; PINHEIRO, S. R.; BATISTA, C. S. A.; VIEGAS, S. A. R. A.;  
556 BATISTA, C. S. A.; COELHO C. P.; MORAES, Z. M.; SOUZA, G. O.; GONÇALVES, A. P.; ALMEIDA,  
557 C. A. S.; VASCONCELLOS, S. A. Soroprevalência de leptospirose em fêmeas bovinas em idade  
558 reprodutiva no Estado da Bahia. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 4, p. 539-546, 2009. URI:  
559 <http://producao.usp.br/handle/BDPI/1894>  
560
- 561 OSAVA, C. F. **Perfil sorológico contra *Rickettsia* spp e *Leptospira* spp e infestação de carrapatos em**  
562 **suínos mantidos sob diferentes sistemas de criação**. 2016. 96 f. Tese de doutorado (Saúde animal),  
563 Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2016.  
564
- 565 PAIXÃO, A. P.; SANTOS, H. P.; ALVES, L. M. C.; PEREIRA, H. M.; CARVALHO, R. F. B.; COSTA  
566 FILHO, V. M.; OLIVEIRA, E. A. A.; SOARES, D. M.; BESERRA, B. A. *Leptospira* spp. em bovinos  
567 leiteiros do estado do Maranhão, Brasil: frequência, fatores de risco e mapeamento de rebanhos reagentes.  
568 **Arquivos do Instituto Biológico**, v.83, p. 1-12, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/1808-1657001022014>  
569
- 570 PELLEGRIN, A. O.; GUIMARÃES, P. H. S.; SERENO, J. R. B.; FIGUEIREDO, J. P.; LAGE, A. P.;  
571 MOREIRA, E. C.; LEITE, R. C. Prevalência da leptospirose em bovinos do Pantanal Mato-Grossense.  
572 Comunicado Técnico 22, **Embrapa Pantanal**, n.22, p.1-9, 1999. URI:  
573 <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/805159/1/COT22.pdf>  
574
- 575 PICARDEAU, M.. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 43,  
576 n. 1, p. 1– 9, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2012.11.005>  
577
- 578 PINTO, P. S.; PESTANA, C.; MEDEIROS, M.A.; LILENBAUM, W. Plurality of *Leptospira* strains on  
579 slaughtered animals suggest a broader concept of adaptability of leptospire to cattle. **Acta Tropica**, v. 172,  
580 p. 156-159, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.04.032>  
581
- 582 PIRES, A.V. **Bovinocultura de corte**. Piracicaba: FEALQ, v.2, cap. 51, p.971-975, 2010.  
583
- 584 PUCHE, R.; FERRÉS, I.; CARABALLO, L.; RANGEL, Y.; PICARDEAU, M.; TAKIFF, H.; IRAOLA, G.  
585 *Leptospira venezuelensis* sp. nov., a new member of the intermediate group isolated from rodents, cattle and  
586 humans. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, p. 513–517, 2018.  
587 DOI: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002528>  
588
- 589 RODRIGUES, R.O.; HERRMANN, G.P.; HEINEMANN, M.B.; LAGE, A.P.; LOPES, L.B.; MOREIRA,  
590 E.C. Comparação entre a imunidade induzida em bovinos vacinados com bacterinas polivalentes comerciais  
591 e uma monovalente experimental. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, p.10-16, 2011. URI:  
592 <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/44553/1/2011AP05.pdf>

- 593 RYAN, T.J.; MARSHALL, R.B. Isolation of a leptospire belonging to serogroup Tarassovi. **New Zealand**  
594 **Veterinary Journal**, v. 24, 212-213, 1976. DOI: <https://doi.org/10.1080/00480169.1976.34320>  
595
- 596 SANTA ROSA, C. A.; SULZER, C. R.; GIORGI, W.; SILVA, A. S.; YANAGUITA, R. M.; LOBÃO, A.O..  
597 Leptospirosis in wildlife in Brazil; isolation of a new serotype in the pyrogenes group. **American Journal of**  
598 **Veterinary Research**, v. 36, n. 9, p. 1363-1365, 1975. PMID: 1163877  
599
- 600 SARMENTO, A. M. C.; AZEVEDO, S. S.; MORAIS, Z. M.; SOUZA, G. O.; OLIVEIRA, F. C. S.;  
601 GONÇALES, A. P.; MIRAGLIA, F.; VASCONCELLOS, S. A.. Emprego de estirpes *Leptospira* spp.  
602 isoladas no Brasil na microtécnica de soroaglutinação microscópica aplicada ao diagnóstico da leptospirose  
603 em rebanhos bovinos de oito estados brasileiros. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 7, p. 601-606,  
604 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2012000700003>  
605
- 606 SONADA, R. B.; DE AZEVEDO, S. S.; SOTO, F. R. M.; DA COSTA, D. F.; DE MORAIS, Z. M.; DE  
607 SOUZA, G. O.; GONÇALES, A. P.; MIRAGLIA, F.; VASCONCELLOS, S. A. Efficacy of leptospiral  
608 commercial vaccines on the protection against an autochthonous strain recovered in Brazil. **Brazilian Journal**  
609 **of Microbiology**, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.06.008>  
610
- 611 SOUZA, M. A.; CASTRO, J. R; MOREIRA, R. Q.; BOMBONATO, N. G; SOARES, P. M., LIMA, A. M.  
612 C. Anticorpos anti-leptospira spp. em diversas espécies animais em uma propriedade rural. **Bioscience**  
613 **Journal**, v. 32, n. 1, p. 202-207, 2016. DOI: <https://doi.org/10.14393/BJ-v32n1a2016-26605>  
614
- 615 TABATA, R.; SCANAVANI NETO, H.; ZUANAZE, M.A.F.; OLIVEIRA, E.M.D.; DIAS, R.A.; MORAIS,  
616 Z.M.; ITO, F.H.; VASCONCELLOS, S.A. Cross neutralizing antibodies in hamsters vaccinated with  
617 leptospiral bacterins produced with three serovars of serogroup Serjoe. **Brazilian Journal of Microbiology**.  
618 v. 33, n. 3, p. 265-268, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822002000300016>  
619
- 620 THRUSFIELD, M. **Veterinary epidemiology**. 3.ed. Oxford: Blackwell Science, 2007. 610p.  
621
- 622 VALE-GONÇALVES, H.M.; CABRAL, J.A.; FARIA, M.C.; NUNES-PEREIRA, M.; FARIA, A.S.;  
623 VELOSO, O.; VIEIRA, M.L.; PAIVA-CARDOSO, M.N. Prevalence of *Leptospira* antibodies in wild boars  
624 (*Sus scrofa*) from Northern Portugal: risk factor analysis. **Epidemiology & Infection**, v. 143, p. 2126-2130,  
625 2014. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0950268814003331>  
626  
627  
628  
629

630 VASCONCELLOS, S. A.; OLIVEIRA, J. C. F.; MORAIS, Z. M.; BARUSELLI, P. S.; AMARAL, R.;  
 631 PINHEIRO, S. R.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S.; SCHÖNBERG, A.; HARTSKEERL, R. A..  
 632 Isolation of *leptospira santarosai*, serovar guaricura from buffaloes (*Bubalus Bubalis*) in Vale do Ribeira,  
 633 São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, n. 4, p. 298-300, 2001. DOI:

634 <https://doi.org/10.1590/S1517-83822001000400008>

635

636 VIEIRA, A. S.; PINTO, P. S.; LILENBAUM, W. A systematic review of leptospirosis on wild animals in  
 637 Latin America. **Tropical Animal Health Production**, v. 50, n. 2, p. 229-238, 2018. DOI:

638 <https://doi.org/10.1007/s11250-017-1429-y>

639

640

## 641 LISTA DE TABELAS

642

643 **Tabela 1.** Frequência de bovinos reagentes ao MAT de acordo com os municípios de origem da região do  
 644 Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, Minas Gerais, 2018.

| MUNICÍPIO              | BOVINOS           |                         |
|------------------------|-------------------|-------------------------|
|                        | TOTAL DE AMOSTRAS | ANIMAIS REAGENTES N (%) |
| Uberlândia             | 65                | 52 (80,0)               |
| Monte Alegre           | 57                | 35 (61,4)               |
| Ituiutaba              | 47                | 39 (83,0)               |
| Santa Vitória          | 77                | 63 (81,8)               |
| São Francisco De Sales | 3                 | 2 (66,7)                |
| Frutal                 | 40                | 27 (67,5)               |
| Veríssimo              | 10                | 10 (100)                |
| Santa Juliana          | 22                | 11 (50)                 |
| Abadia Dos Dourados    | 2                 | 1 (50)                  |
| Serra Do Salitre       | 33                | 15 (45,5)               |
| Estrela Do Sul         | 7                 | 6 (85,7)                |
| Patos De Minas         | 9                 | 6 (66,7)                |
| <b>TOTAL</b>           | <b>372</b>        | <b>267 (71,8)</b>       |

645

646

647

648

649

650

651

652

653 **Tabela 2.** Frequências absoluta e relativa de bovinos reagentes por sorogrupo e sorovares no MAT em títulos  
 654  $\geq 100$ , nos municípios da região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, Minas Gerais, 2018.

| SOROGRUPO           | SOROVARES           | FREQUÊNCIA ABSOLUTA E RELATIVA (%) BOVINOS REAGENTES POR SOROVARES | FREQUÊNCIA ABSOLUTA E RELATIVA (%) BOVINOS REAGENTES POR SOROGRUPO |
|---------------------|---------------------|--|--|
| Sejroe              | Hardjoprajitno      | 109 (40,8) <sup>a</sup>  | 231 (86,5) <sup>a</sup>  |
|                     | Guaricura           | 98 (36,7) <sup>a</sup>   |  |
|                     | Sejroe              | 16 (6,0) <sup>c</sup>  |  |
|                     | Wolffi              | 8 (3,0) <sup>c</sup>   |  |
| Tarassovi           | Tarassovi           | 161 (60,3) <sup>b</sup>  | 161 (60,3) <sup>b</sup>  |
| Hebdomadis          | Hebdomadis          | 78 (29,2) <sup>a</sup>   | 78 (29,2) <sup>c</sup>   |
| Djasiman            | Djasiman            | 21 (7,9) <sup>c</sup>  | 21 (7,9) <sup>d</sup>  |
| Canicola            | Canicola            | 16 (6,0) <sup>c</sup>  | 16 (6,0) <sup>d</sup>  |
| Ballum              | Castellonis         | 12 (4,5) <sup>c</sup>  | 12 (4,5) <sup>d</sup>  |
| Icterohaemorrhagiae | Copenhageni         | 9 (3,4) <sup>c</sup>   | 10 (3,7) <sup>d</sup>  |
|                     | Icterohaemorrhagiae | 1 (0,4) <sup>c</sup>   |  |
| Australis           | Australis           | 3 (1,1) <sup>c</sup>   | 5 (1,9) <sup>d</sup>   |
|                     | Bratislava          | 2 (0,7) <sup>c</sup>   |  |
| Bataviae            | Bataviae            | 4 (1,5) <sup>c</sup>   | 4 (1,5) <sup>d</sup>   |
| Pomona              | Pomona              | 3 (1,1) <sup>c</sup>   | 3 (1,1) <sup>d</sup>   |
| Cynopteri           | Cynopteri           | 1 (0,4) <sup>c</sup>   | 1 (0,4) <sup>d</sup>   |
| Javanica            | Javanica            | 1 (0,4) <sup>c</sup>   | 1 (0,4) <sup>d</sup>   |

655 **Legenda:** Valores seguidos de letras semelhantes, na mesma coluna, não apresentam diferenças significativas ( $p > 0,05$ ); valores  
 656 com letras diferentes, na mesma coluna, apresentam diferença significativa entre eles ( $p > 0,05$ ).

657

658

659

660

661

662

663

664 **Tabela 3.** Resultados de titulação (títulos de 200 a 3.200) do MAT por sorogrupo e sorovares em bovinos  
 665 dos municípios da região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, Minas Gerais, 2018.

| MUNICÍPIOS                        | TÍTULOS | SOROGRUPOS/ SOROVARES REAGENTES TESTE TITULAÇÃO MAT |           |           |          |          |           |           |          |          |
|-----------------------------------|---------|---|-----------|-----------|----------|----------|-----------|-----------|----------|----------|
|                                   |         | TAR   | SEJROE    |           |          |          | HEBD      | CAN       | ICTERO   | BALLUM   |
|                                   |         | Tar   | Guari     | Hp        | Sej      | Wol      | Hebd      | Can       | Cop      | Cast     |
| Uberlândia                        | 200     | 14  | -         | 2         | 2        | -        | -         | -         | -        | -        |
|                                   | 400     | 5   | -         | -         | 1        | -        | -         | -         | -        | -        |
|                                   | 800     | -   | -         | -         | 1        | -        | -         | -         | -        | -        |
|                                   | 3200    | 1   | -         | -         | -        | -        | -         | -         | -        | -        |
| Monte Alegre                      | 200     | 9   | -         | -         | -        | -        | -         | 6         | 3        | -        |
|                                   | 400     | 6   | -         | -         | -        | -        | -         | 2         | -        | -        |
|                                   | 800     | 2   | -         | -         | -        | -        | -         | 1         | 3        | -        |
|                                   | 1600    | -   | -         | -         | -        | -        | -         | 1         | 2        | -        |
|                                   | 3200    | 2   | -         | -         | -        | -        | -         | -         | -        | -        |
| Ituiutaba                         | 200     | 9   | 3         | 4         | 1        | -        | 3         | -         | -        | -        |
|                                   | 400     | 1   | -         | -         | -        | -        | 1         | -         | -        | -        |
|                                   | 800     | 1   | -         | -         | -        | -        | -         | -         | -        | -        |
|                                   | 1600    | -   | -         | 1         | -        | -        | -         | -         | -        | -        |
| Santa Vitória                     | 200     | 14  | 7         | 2         | -        | -        | 4         | -         | -        | -        |
|                                   | 400     | 3   | 5         | -         | -        | -        | 3         | -         | -        | -        |
|                                   | 800     | 2   | 2         | -         | -        | -        | -         | 1         | 1        | 1        |
|                                   | 1600    | -   | 1         | -         | -        | -        | -         | -         | -        | -        |
| São Francisco de Sales            | 200     | 1   | -         | -         | -        | -        | -         | -         | -        | -        |
| Frutal                            | 200     | 5   | -         | -         | -        | -        | -         | -         | -        | -        |
|                                   | 400     | 2   | -         | -         | -        | -        | -         | -         | -        | -        |
|                                   | 800     | 2   | -         | -         | -        | -        | -         | -         | -        | -        |
| Veríssimo                         | 200     | 6   | 2         | -         | -        | -        | 3         | -         | -        | -        |
|                                   | 800     | 1   | -         | -         | -        | -        | -         | -         | -        | -        |
| Santa Juliana                     | 200     | 1   | -         | -         | -        | 2        | -         | -         | -        | -        |
|                                   | 400     | 1   | -         | -         | -        | 2        | -         | -         | -        | -        |
|                                   | 800     | -   | -         | -         | -        | 1        | -         | -         | -        | -        |
| Serra do Salitre                  | 200     | 2   | -         | -         | -        | -        | -         | -         | -        | -        |
|                                   | 400     | 1   | -         | -         | -        | -        | -         | -         | -        | -        |
|                                   | 1600    | 1   | -         | -         | -        | -        | -         | -         | -        | -        |
| Estrela do Sul                    | 200     | 2   | -         | -         | -        | -        | -         | -         | -        | -        |
|                                   | 400     | 2   | -         | -         | -        | -        | -         | -         | -        | -        |
|                                   | 800     | 1   | -         | -         | -        | -        | -         | -         | -        | -        |
| Patos de Minas                    | 200     | 1   | 3         | 1         | -        | -        | 1         | -         | -        | -        |
| <b>TOTAL DE ANIMAIS REAGENTES</b> |         | <b>98</b>   | <b>23</b> | <b>10</b> | <b>5</b> | <b>5</b> | <b>15</b> | <b>11</b> | <b>9</b> | <b>1</b> |

666 Legenda: Can – Canicola; Cast – Castellonis; Cop – Copenhageni; Guari – Guaricura; Hp – Hardjoprajitno; Hebdo – Hebdomadis;  
 667 Sej – Sejroe; Taras – Tarassovi e Wol – Wolffi.

668

669

670

671

672

673

674

675

676 **Tabela 4.** Principais vacinas comercializadas contra leptospirose bovina no Brasil.

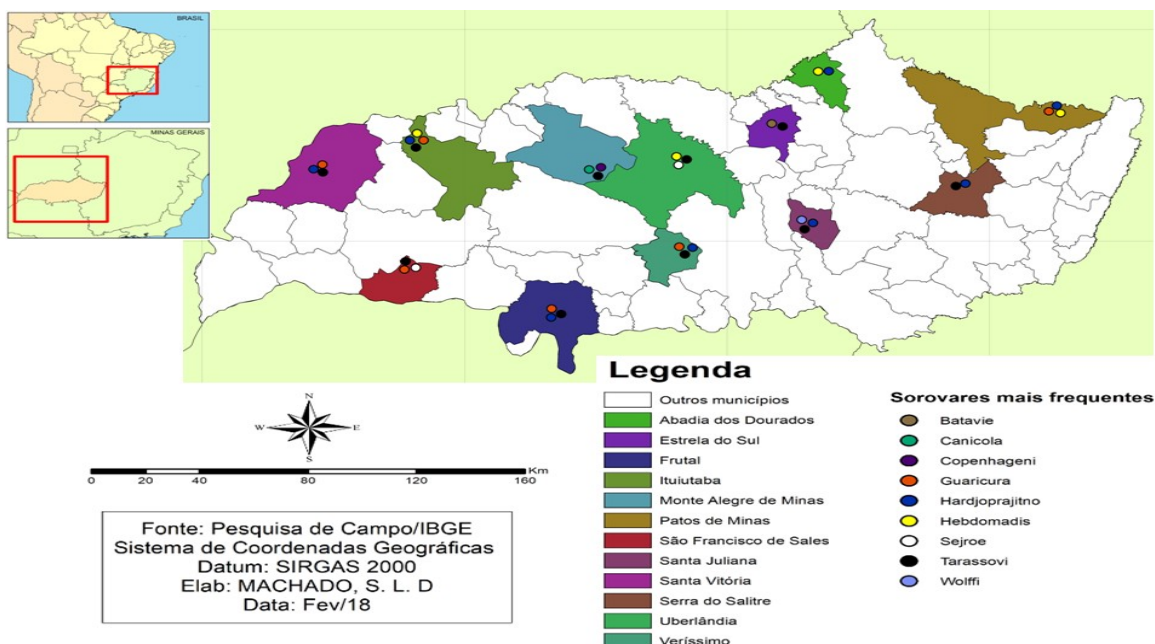
| VACINA<br>(nome comercial)    | LABORATÓRIO        | SOROVARES  |
|-------------------------------|--------------------|--|
| CATTLEMASTER®<br>GOLD FP 5/L5 | ZOETIS             | Canicola; Grippytyphosa; Hardjo; Icterohaemorrhagiae e Pomona  |
| CATTLEMASTER®<br>4+L5         | ZOETIS             | Canicola; Grippytyphosa; Hardjo; Icterohaemorrhagiae e Pomona  |
| HIPRABOVIS® LEPTO             | HIPRA              | Wolffi; Hardjo; Icterohaemorrhagiae; Bratislava e Pomona   |
| LEPTO-BAC® 6                  | ZOETIS             | Pomona; Grippytyphosa; Canicola; Icterohaemorrhagiae; Wolffi e Hardjo  |
| Leptovac-6                    | CEVA               | Hardjo; Pomona; Wolffi; Canicola; Grippytyphosa e Icterohaemorrhagiae  |
| Poliguard                     | VALLÉ              | Pomona, Wolfii, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Canicola e Grippytyphosa  |
| BOVISAN TOTAL Se              | SANTA HELENA       | Pomona; Wolffi; Hardjo; Tarassovi; Icterohaemorrhagiae; Canicola e Grippytyphosa                                   |
| LEPTOVACIN                    | BIOVET             | Hardjo; Icterohaemorrhagiae; Copenhageni; Pomona; Grippytyphosa; Bratislava e Canicola                             |
| BIOLEPTOGEN®                  | BIOGÉNESIS<br>BAGÓ | Bratislava; Canicola; Grippytyphosa; Icterohaemorrhagiae Copenhageni; Pomona; Hardjo e Tarassovi                   |
| Bovigen® Repro Total SE       | VIRBAC             | Pomona; Wolffi; Hardjoprajitno; Icterohaemorrhagiae; Canicola; Copenhageni; Bratislava e Hardjobovis               |
| Leptoven 10                   | VENCOFARMA         | Icterohaemorrhagiae; Canicola; Copenhageni; Pomona; Wolffi; Grippytyphosa; Tarassovi; Hardjo, Pyrogenes e Bataviae |

677

678

679 **LISTA DE FIGURAS**

680 **Figura 1.** Distribuição dos sorovares mais frequentes, em bovinos reagentes no MAT, por municípios da  
681 região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, Minas Gerais, 2018.



682



### **CAPÍTULO III**

**Identificação sorológica e molecular da primeira estirpe de *Leptospira kirschneri* sorogrupo**

**Grippotyphosa isolada da urina de bovino em Minas Gerais, Brasil**

**(Capítulo em formato de artigo científico para posterior submissão)**

1 **Identificação sorológica e molecular da primeira estirpe de *Leptospira kirschneri* sorogrupo Grippotyphosa**  
2 **isolada da urina de bovino em Minas Gerais, Brasil**

3 Pollyanna M. Soares<sup>a\*</sup>, Dayane O. Gomes<sup>a</sup>, Fernando P. Macedo<sup>a</sup>, Mayara M. Soares<sup>a</sup>, Karla R. Lemes<sup>a</sup>, Lauren H.  
4 Jaeger<sup>b</sup>, Walter Lilenbaum<sup>b</sup>, Anna M. C. Lima<sup>a</sup>

5 <sup>a</sup> Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Laboratório de Doenças Infectocontagiosas, Universidade Federal  
6 de Uberlândia, Uberlândia - MG, Brasil.

7 <sup>b</sup> Instituto Biomédico, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói - RJ,  
8 Brasil.

9 \*Corresponding author - e-mail addresses: pollymafra@yahoo.com.br

10  
11 **RESUMO**

12 A leptospirose é uma zoonose de abrangência mundial causada por uma bactéria do gênero *Leptospira* que acomete  
13 animais domésticos, inclusive bovinos. O estado de Minas Gerais possui um dos maiores rebanhos de bovinos no Brasil  
14 e se destaca pela produção de leite e carne. Apesar de ser um estado de grande desenvolvimento na bovinocultura  
15 brasileira, pouco se sabe sobre a epidemiologia da leptospirose em bovinos em Minas Gerais, devido a escassez de  
16 pesquisas com isolamentos de estirpes de *Leptospira*. Nesse sentido, o objetivo desta pesquisa foi realizar a cultura de  
17 372 amostras de urina e rim de bovinos oriundas das regiões do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba (Minas Gerais,  
18 Brasil), para proceder ao isolamento, e a caracterização sorológica e molecular da estirpe isolada utilizando as técnicas  
19 sorogrupagem, PCR utilizando o gene *lipL32*, genotipagem com os genes *rrs* e *secY*, e análise de VNTR (*Variable*  
20 *Number of Tandem Repeats*). Das culturas avaliadas, foi possível isolar uma estirpe de *Leptospira* de apenas uma  
21 cultura de urina, pertencente a um bovino macho destinado ao abate sem alteração no exame ante-mortem.  
22 Posteriormente a estirpe isolada foi identificada como UFU02 e caracterizada como *Leptospira kirschneri* sorogrupo  
23 Grippotyphosa, sendo a primeiro relato de isolamento de uma estirpe com essas características no estado de Minas  
24 Gerais, Brasil. O sorogrupo identificado é mais frequente em espécies silvestres, e o fato de ser detectado na urina de  
25 bovinos, indica a possibilidade de transmissão entre espécies, destacando a importância dos isolamentos para o  
26 conhecimento da epidemiologia da doença nas áreas pesquisadas, afim de estabelecer medidas de controle mais  
27 efetivas.

28 **Keywords:** Leptospirose bovina. Grippotyphosa. Isolamento.

29  
30 **1. INTRODUÇÃO**

31 A leptospirose é uma doença infectocontagiosa causada por espiroquetas pertencentes ao gênero *Leptospira*  
32 sp., reportada no mundo todo, com maior frequência em países tropicais, afetando o homem, animais silvestres e  
33 domésticos, apresentando grande importância para saúde pública e animal (Desvars et al., 2011; Ellis, 2015).

34 Em animais de produção, geralmente a leptospirose manifesta-se causando perdas produtivas relacionadas a  
35 repetições de cio, abortos, natimortos, recém-nascidos fracos com diminuição da taxa de crescimento (Adler;  
36 Moctezuma, 2010; Director et al., 2014).

37 A leptospira entra no hospedeiro através de lesões na pele e mucosas, invadindo a circulação sanguínea  
38 (leptospiemia) e se espalhando por todo o organismo do animal. Após esta fase inicial, a leptospira se instala nos  
39 túbulos renais dos animais infectados, sendo excretada por longos períodos através da urina (leptospiúria), promovendo  
40 a contaminação do ambiente e de outros animais (Ellis, 2015; Rocha et al., 2017).

41 O teste de Soroaglutinação microscópica (MAT) é considerado de referência entre os vários métodos  
42 sorológicos para diagnóstico de leptospirose em animais, o qual detecta as imunoglobulinas M e G aglutinantes,  
43 apresentando algumas limitações, devido a ocorrência de reações cruzadas entre espécies do gênero leptospira com  
44 características antigênicas similares, inviabilizando um diagnóstico preciso do agente infectante, além de necessitar da  
45 manutenção de um grande painel de culturas patogênicas de leptospira e representar risco de infecção à técnicos que  
46 realizam este teste (Sugunan et al., 2004; Chiareli et al., 2012; Niloofa et al., 2015).

47 Desta forma, o isolamento e identificação de estirpes de leptospirosas que infectam os rebanhos bovinos  
48 brasileiros são necessários para obter um diagnóstico definitivo, permitindo o fornecimento de dados para estudos  
49 epidemiológicos e principalmente para nortear desenvolvimento de meios profiláticos de controle da leptospirose  
50 bovina, diminuindo o risco da transmissão zoonótica por meio do contato com animais naturalmente infectados.

51 Minas Gerais destaca-se na bovinocultura de corte por ser o quinto estado que mais abate bovinos no Brasil, e  
52 principalmente na bovinocultura de leite, por ser o estado que mais produz leite no território brasileiro, ocupando o  
53 quinto lugar no ranking de produção mundial (Brasil, 2016). No entanto, há poucos estudos sobre isolamento e  
54 caracterização da leptospira em bovinos no estado, desconhecendo-se as principais estirpes de leptospira que afetam  
55 esta espécie e conseqüentemente os aspectos epidemiológicos da leptospirose bovina em Minas Gerais.

56 Os estudos já realizados com isolamento no estado verificaram a presença do sorovar Hardjoprajitno, adaptado  
57 a bovinos e pertencentes ao sorogrupo Sejroe (Moreira, 1994; Chiareli et al., 2012, Cosate et al., 2017). No entanto,  
58 Pinto et al. (2017) relataram a necessidade de elucidar o verdadeiro papel de outras estirpes (não-Hardjo) na  
59 determinação de doenças ou da transmissão em bovinos livres de sinais clínicos aparentes de infecção aguda.

60 Nesse sentido, para averiguar a possibilidade de ocorrência de estirpes que já foram isoladas ou novas estirpes  
61 no estado de Minas Gerais e expandir o conhecimento sobre a epidemiologia da doença no estado, o objetivo deste  
62 estudo foi realizar a cultura de 372 amostras de urina e rim de bovinos oriundas das regiões do Triângulo Mineiro e Alto  
63 Paranaíba (Minas Gerais, Brasil), e posteriormente proceder ao isolamento e a caracterização sorológica e molecular das  
64 estirpes de *Leptospira* isoladas.

## 65 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 66 2.1. Amostras

67 Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de  
68 Uberlândia (UFU) sob nº de protocolo 018/16.

69 Foram colhidas amostras de urina e rim de 372 bovinos abatidos em dois frigoríficos situados na região do  
70 Triângulo Mineiro, de diferentes idades e ambos os sexos, sem alteração no exame ante-mortem e sem informação  
71 sobre o manejo sanitário desses animais, principalmente quanto à vacinação contra leptospirose. Estes animais eram  
72 oriundos de 15 propriedades localizadas em 12 municípios da região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, do estado  
73 de Minas Gerais, Brasil.

### 74

### 75 2.2. Preparo de amostras de urina e rim para isolamento

76 O preparo das amostras de rim e urina para isolamento foi realizado em capela de fluxo laminar no Laboratório  
77 de Doenças Infectocontagiosas (LADOC) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

78 As amostras coletadas de cada rim foram cortadas, aleatoriamente, em três porções (do córtex à medula renal)  
79 e maceradas em 3,0mL de salina até a obtenção de um caldo, posteriormente, 1,0mL do caldo das amostras de cada rim  
80 e 1,0mL das amostras de urina foram inoculadas em tubos com 5,0mL de meio de cultura estéril EMJH (Difco  
81 Laboratories, Detroit, Estados Unidos), conforme descrito por Faine et al. (1999), com adição dos antibióticos 5-  
82 fluoruracil (300 mg/L) e ácido nalidíxico (20 mg/L), em três diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ , e encaminhadas para  
83 armazenamento em estufa a 30°C, conforme descrito por Miraglia et al. (2009) com adaptações no protocolo.

84 Após uma semana, procedeu-se a leitura das amostras em meio EMJH com antibiótico com o auxílio de um  
85 microscópio óptico de campo escuro (Zeiss, Standort Göttingen, Vertrieb, Alemanha). As amostras contaminadas foram  
86 descartadas, e as demais que apresentaram campo limpo e estruturas parecidas com leptospiros, foram repicadas em  
87 alíquotas de 0,5mL para tubos com 5mL de meio EMJH sem a adição de antibióticos e armazenadas em estufa a 30°C.  
88 Este procedimento foi repetido semanalmente.

89 As amostras com estruturas semelhantes à leptospiros foram repicadas em duplicata, sendo um tubo estocado  
90 no laboratório da UFU em estufa a 30°C, repicado semanalmente, do qual foi retirada uma alíquota de 1500µL para  
91 diluição em 37,5µL de Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo (DMSO) com posterior congelamento em nitrogênio  
92 líquido; e um tubo enviado para o Laboratório de Bacteriologia da Universidade Federal Fluminense (UFF) para  
93 verificação da estrutura, e posteriores testes de sorogrupagem e PCR.

94

95

### 96 2.3. Sorogrupagem

97 Os isolados foram submetidos à técnica sorogrupagem, no Laboratório de bacteriologia da Universidade  
98 Federal Fluminense (UFF). Nesta técnica utilizam-se antissoros conhecidos para determinar a qual sorogrupo o isolado  
99 pertence (Dikken; Kmety, 1978). Portanto, foi utilizado um painel de antissoros incluindo 32 sorovares representando  
100 28 sorogrupos (de Royal Tropical Institute - KIT, Amsterdã), colocados na presença do isolado. Sendo considerado  
101 infectante, o sorogrupo, cujo soro recíproco apresentou maior título.

102

### 103 2.4. Protocolo de PCR realizado no Laboratório de Bacteriologia Veterinária da UFF

#### 104 2.4.1 Extração de DNA e Reação em cadeia da polimerase (PCR)

105 As culturas de *Leptospira* sp. com crescimento bacteriano entre  $10^7$  a  $10^8$  células/mL foram submetidas a  
106 extração de DNA com Wizard SV Genomic DNA Purification System® (Promega) conforme instruções do fabricante.  
107 A PCR convencional com o gene *lipL32* foi realizada para detecção de leptospiras do grupo patogênicas, com os  
108 primers *lipL32-45F* (5'-AAG CAT TAC CGC TTG TGG TG-3') e *LipL32-286R* (5'-GAA CTC CCA TTT CAG CGA  
109 TT-3') (Stoddard et al. 2009). A reação foi realizada com volume final de 25  $\mu$ L, contendo 10 X de Buffer, 2,5 mM de  
110  $MgCl_2$ , 0,6 picomol de cada primer, 25 mM de dNTPs, 1 U de GoTaq® DNA Polymerase (Promega) e 30 ng de DNA  
111 extraído da amostra. As amplificações foram realizadas com uma desnaturação inicial de 94°C (2 min), seguido de 40  
112 ciclos de 94°C (30 seg), 52°C (30 seg) e 72°C (1 min), e extensão final de 72°C (5 min).

113 Para determinar a espécie de *Leptospira* foi realizada por meio de PCR e sequenciamento nucleotídico dos  
114 genes *rrs* (16S rRNA) e *secY*. Os primers utilizados para a amplificação do gene *rrs* foram 16S fD1 (5'-AGA GTT  
115 TGA TCC TGG CTC AG-3') e 16S rP2 (5'-ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT-3') (Weisburg et al. 1991). A  
116 reação foi realizada com volume final de 50  $\mu$ L, contendo 10X de Buffer, 2,0 mM de  $MgCl_2$ , 0,6 picomol de cada  
117 primer, 25 mM de dNTPs, 0,5 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e 30 ng de DNA extraído da amostra. As  
118 amplificações foram realizadas com uma desnaturação inicial de 95 °C (5 min), seguido de 35 ciclos de 95 °C (2 min),  
119 42 °C (30 seg) e 72°C (3 min), e extensão final de 72°C 10 min. Os primers utilizados para a amplificação parcial do  
120 gene *secY* foram *secYF* (5'-ATG CCG ATC ATT TTT GCT TC-3') e *secYR* (5'-CCG TCC CTT AAT TTT AGA CTT  
121 CTT C-3'), desenhados por Ahmed et al. (2006). A reação foi realizada com volume final de 50  $\mu$ L, contendo 10X de  
122 Buffer, 1,5 mM de  $MgCl_2$ , 0,6 picomol de cada primer, 25 mM de dNTPs, 0,5 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen)  
123 e 30 ng de DNA. O programa de temperaturas incluiu: uma desnaturação inicial de 95 °C por 5 min, seguido de 35  
124 ciclos de 94 °C (30 seg), 58 °C (30 seg), 72°C (1 min), e extensão final de 72 °C (7 min).

125 A eletroforese em gel de agarose 1,5%, utilizando o corante GelRed (Invitrogen), foi realizada e os resultados  
126 foram visualizados sob luz ultra violeta. A estirpe Fiocruz L1-130 foi utilizada como controle positivo. Foram incluídos  
127 controles negativos da extração e da PCR.

128

#### 129 2.4.2. Sequenciamento nucleotídico e inferências filogenéticas

130 Os produtos de PCR foram purificados com Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). A reação  
131 de sequenciamento nucleotídico foi realizada utilizando o BigDye Terminator v3.1 kit (Applied Biosystems). O  
132 sequenciamento nucleotídico do gene *rrs* incluiu a utilização de *primers* internos, Lepto16SF1 (5'-GGC GGY GCT  
133 CTT WAW CAT-3') e Lepto16SR2 (5'-ATC CCG TTC ACT ACC CAC GC-3') (Fenner et al. 2010), além dos  
134 anteriormente descritos. A eletroforese capilar foi realizada em um sequenciador automático ABI 3730 (Applied  
135 Biosystems). As sequências foram editadas utilizando os programas BioEdit v.7.0.4. (Hall, 1999) e MEGA v.6 (Tamura  
136 et al., 2013). As sequências obtidas foram comparadas com sequências referência do banco mundial de sequências do  
137 *National Center for Biotechnology Information* (GenBank <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando a ferramenta *Basic*  
138 *Local Alignment Search Tool* (BLAST <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>). A árvore filogenética foi construída  
139 utilizando o método da Máxima Verossimilhança (*bootstrap* de 1.000 replicatas), modelo de substituição Kimura 2-  
140 parâmetros, utilizando o software MEGA v.6 (Tamura et al., 2013).

141

#### 142 2.4.3. Variable-Number Tandem-Repeat (VNTR)

143 A técnica do VNTR teve o objetivo de genotipar a estirpe de leptospira estudada. O protocolo utilizado para *L.*  
144 *interrogans*/ *L. kirschneri* envolveu três alvos genéticos: VNTR4 (primers F 5'-CAA AAT CAG TCA CTA CCC TG-3'  
145 e R 5'-CTT TGT TGG AGC GCA ATC TC-3'); VNTR7 (primers F 5'-TCA TCT GCT CCG GAG ATT CG-3' e R 5'-  
146 TCC CTC CAC AGG TTG TCT TG-3'); e VNTR10 (primers F 5'-TCC AAA ATT CAG CCC TCA AG-3' e R 5'-  
147 GAC GCT TGG CAT TTG TAT CC-3'), conforme Majed et al. (2005). A reação foi realizada com volume final de 25  
148 µL, contendo 10X de Buffer, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,6 picomol de cada primer, 25 mM de dNTPs, 0,5 U de Taq  
149 polymerase (Amersham) e 30 ng de DNA. O programa de temperaturas incluiu: uma desnaturação inicial de 94°C (5  
150 min), seguido de 35 ciclos de 94°C (30 seg), 55°C (30s) e 72°C (1 min e 30 seg), e extensão final de 72°C (10 min). A  
151 eletroforese em gel de agarose 1,5%, utilizando o corante GelRed (Invitrogen), foi realizada e os resultados foram  
152 visualizados sob luz ultra violeta. O número de repetições de cada alvo de VNTR foi calculado conforme Salaün et al.  
153 (2006).

154

155

156 **3. RESULTADOS**

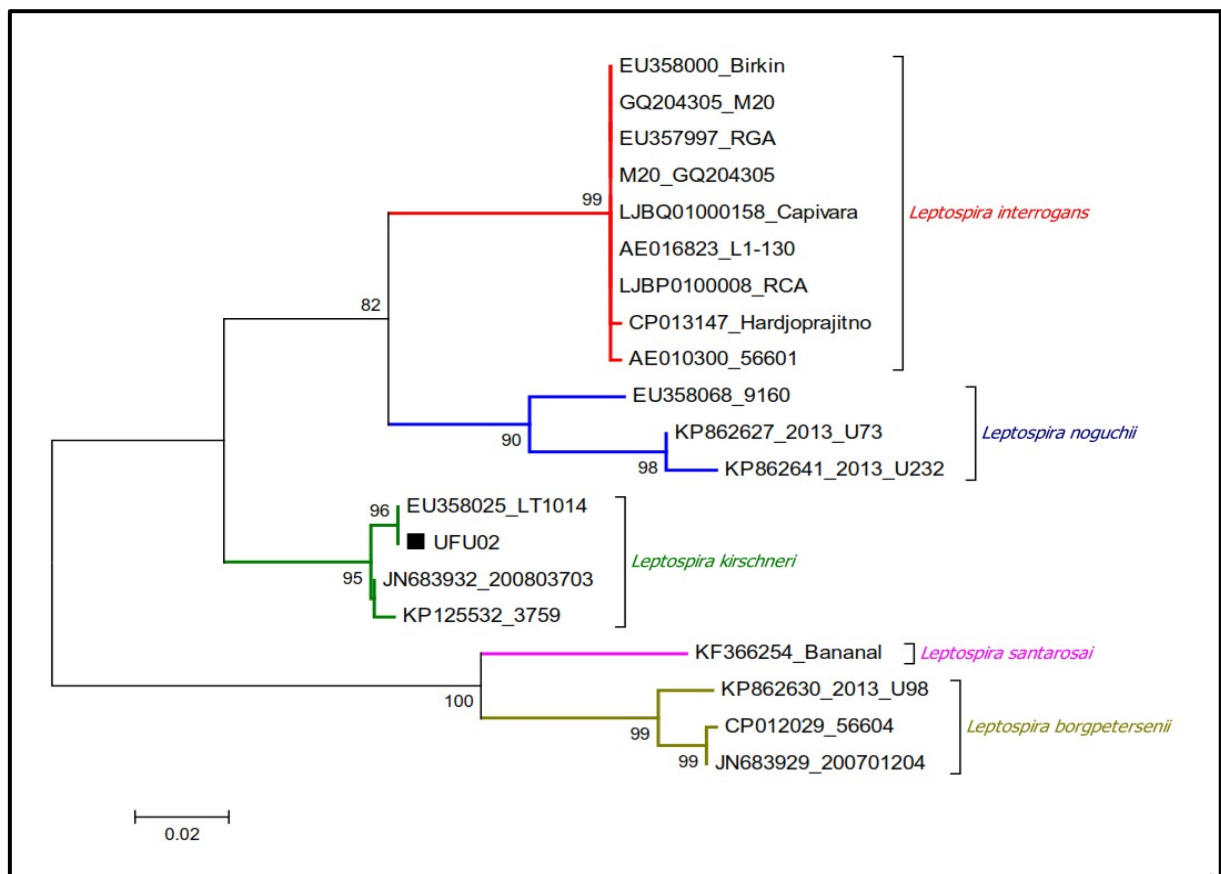
157 No processo de isolamento, dos 372 tubos com cultura de amostras de urina e dos 372 com cultura de amostras  
 158 de rim, apenas três tubos de urina e 23 de rim foram encaminhadas para o Laboratório de Bacteriologia da UFF, porém  
 159 só foi possível o isolamento de *Leptospira* em apenas um tubo com cultura de amostra de urina, pertencente a um bovino  
 160 macho criado em sistema de confinamento na região do Triângulo Mineiro, a qual apresentou um título de 25.600 no  
 161 teste de sorogrupagem para o antissoro pertencente ao sorogrupo Grippotyphosa. Sete tubos apresentaram estruturas  
 162 semelhantes à leptospiros, desses, cinco responderam ao PCR, porém, mesmo com a utilização dos antibióticos, o nível  
 163 de contaminação foi alto, tornando o isolamento inviável nessas amostras.

164 A estirpe isolada identificada como UFU02, apresentando uma PCR positiva para o alvo *lipL32*, responsável  
 165 pela detecção de leptospiros patogênicos. Essa estirpe foi identificada a nível de espécie como *Leptospira kirschneri* no  
 166 sequenciamento nucleotídico do gene *rrs*; e pela genotipagem pelo gene *secY* permitiu a determinação de 100% de  
 167 similaridade com a estirpe LT1014 *L. kirschneri* sorovar Galtoni (número de acesso no GenBank EU358025), sendo  
 168 possível confirmar a espécie *L. kirschneri*, através desse alvo genético (Figura 1). A genotipagem realizada pela técnica  
 169 do VNTR determinou o genótipo VNTR4=2, VNTR7= 14 e VNTR10= 10 para estirpe estudada.

170

171 **Figura 1:** Árvore filogenética do gene *secY* (método Máxima Verossimilhança, bootstrap de 1.000 replicatas).  
 172 Quadrado: estirpe UFU02.

173



174

#### 175 4. DISCUSSÃO

176 A caracterização sorológica da estirpe isolada UFU02 permitiu identificá-la como pertencente ao sorogrupo  
177 Grippotyphosa, enquanto a caracterização molecular por sequenciamento parcial dos genes *secY* e *rrs*, a identificou  
178 como genomoespécie *L. kirschneri*, com uma alta similaridade com sorovar Galtoni estirpe LT1014 de acordo com a  
179 sequência de nucleotídeos do gene *secY*.

180 O sequenciamento pelo gene *secY* do DNA extraído de leptospiros isoladas de amostras clínicas permitem uma  
181 triagem simples e rápida com a identificação do sorovar presuntivo, sendo realizado em isolados de amostras clínicas de  
182 origem humana e atualmente é muito utilizado em isolados de amostras animais através de classificações filogenéticas  
183 da *Leptospira* (Bourhy et al., 2013; Hamond et al., 2016).

184 A estirpe LT1014 (sorovar Galtoni) foi isolada pela primeira vez nos rins de uma vaca em 1964 na província  
185 de Azul, na Argentina, conforme Tedesco et al. (1969), sendo inserida dentro do sorogrupo Canicola, diferenciando dos  
186 resultados encontrados nesse estudo, o qual detectou a estirpe isolada UFU02 como pertencente ao sorogrupo  
187 Grippotyphosa em alta titulação, não apresentando reatividade para o antissoro do sorogrupo Canicola.

188 Devido ao sequenciamento parcial pelo gene *secY* ser similar ao sorovar Galtoni (estirpe LT1014) e diante das  
189 diferenças nos resultados de sorogrupagem da estirpe isolada nesse estudo com a LT1014, pode-se afirmar que  
190 geneticamente a estirpe UFU02 é muito similar à LT1014, porém não são as mesmas estirpes, pois teriam que responder  
191 ao mesmo sorogrupo, o que não foi verificado nesse estudo.

192 Essas diferenças encontradas, reforça a tese de Levett (2001) e Cosate et al. (2017), de que a classificação dos  
193 sorovares de *Leptospira* baseada em regiões genômicas muitas vezes não corresponde à sua classificação na análise  
194 sorológica. Para superar essa limitação, técnicas de biologia molecular estão sendo utilizadas, tais como a análise em  
195 PCR usando o VNTR, a qual demonstra ser promissora na distinção dos sorovares de *Leptospira* (Ahmed et al., 2015).

196 Nesse estudo além da análise molecular por PCR e sequenciamento nucleotídico dos genes *rrs* (16S rRNA) e  
197 *secY* para determinar a espécie da estirpe isolada, a técnica de VNTR também foi utilizada e permitiu verificar um  
198 perfil diferente da estirpe LT1014 (VNTR4=1, VNTR7=1, e VNTR10=16), bem como, das estirpes pertencentes ao  
199 sorogrupo Grippotyphosa conforme a caracterização molecular realizada por Salaün et al. (2006).

200 Um novo padrão de VNTR foi encontrado para estirpe UFU02 (*L. Kirschneri* sorogrupo Grippotyphosa),  
201 sugerindo uma alta heterogeneidade existente entre as estirpes deste sorogrupo. Essa heterogeneidade não foi observada  
202 por Hamond et al. (2016) que isolaram pela primeira vez uma estirpe de *L. kirschneri* sorogrupo Grippotyphosa da urina  
203 de uma égua após aborto, que ao ser caracterizada, apresentou um perfil próximo ao da estirpe Moskva V, isolada  
204 anteriormente, em humano na Rússia.



205 Feresu et al. (1995), em Zimbabwe, na África, também isolaram dos rins de bovinos uma estirpe *L. kirschneri*  
206 sorogrupo Grippytyphosa, e afirmaram que ela seria semelhante antigenicamente aos sorovares Ratnapura,  
207 Grippytyphosa e Valbuzzi, também pertencentes ao mesmo sorogrupo. Enquanto, Delooz et al. (2017), no sul da  
208 Bélgica, isolaram de um *pool* de amostras de baço, rim, fígado e fragmento de placenta de fetos ictericos abortados  
209 congenitamente infectados por *Leptospira* estirpes pertencentes a *L. interrogans* sorogrupo Australis e *L. kirschneri*  
210 sorogrupo Grippytyphosa, e associaram essas estirpes como causadoras da icterícia congênita.

211 No rebanho bovino brasileiro, nenhum dos isolados foi caracterizado como a estirpe UFU02 (*L. kirschneri*  
212 sorogrupo Grippytyphosa), sendo relatados apenas em pesquisas de outros países. No entanto, outras estirpes já foram  
213 isoladas em alguns estados brasileiros.

214 No estado do Rio de Janeiro foi isolado a partir da urina e fluido vaginal de bovinos abatidos (livres de sinais  
215 clínicos aparentes no exame ante-mortem), os sorogrupos Autumnalis e Panama pertencente à espécie de *L. noguchi*  
216 (Martins et al., 2015); cinco estirpes pertencentes a *L. santarosai* sorogrupo Sejroe com alto nível de homologia com o  
217 sorovar Guaricura (Loureiro et al., 2016); Sarmin, Tarassovi, Shermani, Grippytyphosa e Sejroe pertencentes às  
218 espécies *Leptospira santarosai*, *L. alstonii* e *L. interrogans* (Pinto et al., 2017). No Paraná, Chideroli et al. (2016) e  
219 Chideroli et al. (2017) isolaram da urina de vacas naturalmente infectadas, estirpes pertencentes ao sorogrupo Sejroe,  
220 tais como *L. borgpetersenii* sorovar Hardjobovis e uma de *L. interrogans* sorovar Hardjoprajitno, respectivamente.

221 Segundo Pinto et al. (2017), a leptospirose em bovinos ocorre de forma assintomática, em grande parte dos  
222 casos, pelos sorovares adaptados ao hospedeiro, principalmente aos que pertencem ao sorogrupo Sejroe, com o sorovar  
223 Hardjo (tipos Hardjoprajitno e Hardjobovis). Porém, eles relataram que 57,9% dos isolados obtidos não pertenciam ao  
224 sorogrupo Sejroe, indicando uma grande variedade de sorogrupos obtidos de bovinos sem sinais clínicos aparentes e  
225 destacando o desconhecimento sobre o real mecanismo de adaptação dessas estirpes de leptospiros aos bovinos, não  
226 podendo ser negligenciada a possibilidade de serem mantidas por eles, devendo-se considerar este aspecto na  
227 epidemiologia e controle da doença.

228 Uma grande variedade de sorovares pertencentes ao sorogrupo Grippytyphosa foram relatados causando  
229 infecções incidentais em bovinos em algumas partes do mundo (Adler, 2015).

230 No Brasil, as infecções incidentais causadas pelo sorogrupo Grippytyphosa têm como possíveis reservatórios  
231 naturais, os marsupiais. Estudos sorológicos de Caldas, Fehringer e Sampaio (1992) mostraram que os marsupiais,  
232 gambás (*Didelphis marsupialis*), e os ratos da espécie *Rattus norvegicus* foram reativos ao sorovar Grippytyphosa, tais  
233 achados confirmam a afirmação de Faine et al. (1999), que relataram que os gambás podem viver no mesmo ambiente  
234 que as espécies sinantrópicas *Rattus norvegicus*, *Rattus rattus* e *Mus musculus*, que albergam e são reservatórios de

235 *Leptospira* spp., promovendo a contaminação ambiental através do aumento da disseminação do agente patogênico e a  
236 manutenção deste sorovar por várias espécies silvestres.

237 A leptospirose é uma doença de ocorrência endêmica, associada diretamente ao ambiente, podendo apresentar  
238 picos epidêmicos relacionados a alterações desordenadas do sistema ecológico causadas pela interferência humana, de  
239 forma a gerar grandes mudanças no ambiente natural, atingindo novos ecossistemas e promovendo a disseminação de  
240 leptospiras em novas áreas e novos hospedeiros, inclusive na população humana (Mascolli, 2001).

241 Mgode et al. (2015) e Barragan et al. (2016) demonstraram através do isolamento de leptospiras,  
242 respectivamente na África e no Equador, que os roedores, bovinos e suínos, são importantes reservatórios e fontes de  
243 transmissão humana. Na região Sul do Brasil, Cunha et al. (2016) e Balassiano et al. (2017) realizaram o isolamento de  
244 *L. kirschneri* sorogrupo Pomona sorovar Mozdok em cão e em humanos com leptospirose severa nos perímetros rural e  
245 urbano, mostrando também a possibilidade de transmissão da leptospira entre animais domésticos, silvestres e humanos.

246 Em Minas Gerais, um estudo sorológico realizado em amostras de pacientes humanos com suspeita de  
247 leptospirose, verificou a presença do sorovar Grippytyphosa (*L. kirschneri* sorogrupo Grippytyphosa) entre outros  
248 sorovares, como sendo um dos mais comuns, com títulos acima de 800, demonstrando a sua disseminação na população  
249 humana (Oliveira et al., 2017).

250 A *Leptospira* encontra-se circulante no meio ambiente entre diversas espécies de animais domésticos e  
251 silvestres, inclusive em humanos, reforçando o conceito de *one health*. Devido a grande importância da leptospirose  
252 para saúde pública e animal, a realização de mais estudos sorológicos e de isolamento e identificação das leptospiras são  
253 necessários para conhecer os aspectos epidemiológicos da doença no ecossistema local, averiguando possíveis fontes de  
254 transmissão e potenciais reservatórios de leptospira, a fim de promover o desenvolvimento de métodos de controle  
255 efetivos e a conscientização pública da doença para populações de alto risco residentes na área rural (agricultores,  
256 criadores de gado, pescadores, trabalhadores de matadouros) e na área urbana em contato com roedores peridomésticos  
257 (Mgode et al., 2015; Barragan et al., 2016; Cunha et al., 2016; Balassiano et al. 2017; Oliveira et al., 2017).

258 No isolamento, são inúmeras as dificuldades na obtenção de resultados conclusivos por problemas de  
259 contaminação com outros microorganismos, principalmente quando realizado com culturas de fontes não-estéreis, como  
260 urina e tecidos fetais (Adler et al., 1986). Embora essas dificuldades também tenham ocorrido nesse estudo, foi possível  
261 isolar e a identificar da estirpe UFU02, caracterizada como *L. Kirschneri* sorogrupo Grippytyphosa.

262 É possível concluir que esta estirpe UFU02 foi isolada em bovino em Minas Gerais pela primeira vez,  
263 constatando uma contaminação no ambiente por leptospiras e risco de transmissão para animais domésticos e silvestres,  
264 inclusive humanos que convivem com esses animais.

265

266 **5. REFERÊNCIAS**

- 267 Adler, B., Faine, S., Christopher, W. L., Chappel, R. J., 1986. Development of an improved selective medium for isolation of leptospire from clinical  
268 material. *Vet. Microbiol.* 12, 377-381. DOI: [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(86\)90087-8](https://doi.org/10.1016/0378-1135(86)90087-8)
- 269 Adler, B., Moctezuma, A.P., 2010. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet. Microbiol.* 140, 287–296. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.012>
- 270 Adler, B., 2015. *Current Topics in Microbiology and Immunology: Leptospira and Leptospirosis*. Springer Berlin Heidelberg: Germany. 295p.
- 271 Ahmed, N., Devi, S.M., Valverde, M.de L, Vijayachari, P., Machang'u, R.S., Ellis, W.A., Hartskeerl, R.A. 2006. Multilocus sequence typing method  
272 for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 5, 1-10. DOI:  
273 <https://doi.org/10.1186/1476-0711-5-28>
- 274 Ahmed, A., Ferreira, A.S., Hartskeerl, R.A. 2015. Multilocus sequence typing (MLST): markers for the traceability of pathogenic *Leptospira* strains.  
275 *Methods Mol. Biol.* 1247, 349–359. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007093>
- 276 Balassiano, I.T., Vital-Brazil, J.M., Ramos, T.M.V., Timm, L.N., Pereira, M.M., 2017. Molecular and serological characterization of *Leptospira*  
277 *kirschneri* serogroup Pomona isolated from a human case in a Brazilian rural area. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 50, 396-398. DOI:  
278 <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0445-2016>
- 279 Barragan, V., Chiriboga, J., Miller, E., Olivas, S., Birdsell, D., Hepp, C., Hornstra, H., Schupp, J.M., Morales, M., Gonzalez, M., Reyes, S., De la  
280 Cruz, C., Keim, P., Hartskeerl, R., Trueba, R., Pearson, T. 2016. High *Leptospira* Diversity in Animals and Humans Complicates the Search for  
281 Common Reservoirs of Human Disease in Rural Ecuador. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, 1-14. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004990>
- 282 Bourhy, P., Herrmann Storck, C., Theodose, R., Olive, C., Nicolas, M., Hochedez, P., Lamaury, I., Zinini, F., Bremont, S., Landier, A., Cassadou, S.,  
283 Rosine, J., Picardeau, M. 2013. Serovar diversity of pathogenic *Leptospira* circulating in the French West Indies. *PLoS Negl. Trop Dis.* 7, 1-10.  
284 DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002114>
- 285 Brasil. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária. Pesquisa da Pecuária  
286 Municipal e Pesquisa trimestral do abate de animais de 2016, 2016.
- 287 Caldas, E.M., Fehringer, W.T., Sampaio, M.B., 1992. Aglutininas anti-leptospiras em *Rattus norvegicus* e *Didelphis marsupialis*, em Salvador, -  
288 Bahia. *Arq. Esc. Med. Vet.* 15, 4350.
- 289 Chiareli, D., Cosate, M.R.V., Moreira, E.C., Leite, R.C., Lobato, F.C.F., Silva, J.A., Teixeira, J.F.B., Marcelino, A.P., 2012. Controle da leptospirose  
290 em bovinos de leite com vacina autógena em Santo Antônio do Monte, Minas Gerais. *Pesq. Vet. Bras.* 32, 633-639. DOI:  
291 <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2012000700008>
- 292 Chideroli, R.T.; Pereira, U. P.; Gonçalves, D. D.; Nakamura, A. Y.; Alfieri, A. A.; Alfieri, A. F.; Freitas, J. C. 2016. Isolation and molecular  
293 characterization of *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo strain Hardjobovis in the urine of naturally infected cattle in Brazil. *Genetics*  
294 *Genet. Mol. Res.* 15, 1-7. DOI: <https://doi.org/10.4238/gmr.15018473>
- 295 Chideroli, R. T.; Gonçalves, D. D.; Suphoronski, S. A.; Alfieri, A. F.; Alfieri, A. A.; De Oliveira, A. G.; De Freitas, J. C.; Pereira, U. P. 2017.  
296 Culture Strategies for Isolation of Fastidious *Leptospira* Serovar Hardjo and Molecular Differentiation of Genotypes Hardjobovis and  
297 Hardjoprajitno. *Front. Microbiol.* 8,1-8. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02155>
- 298 Cosate, M.R.V., Sakamoto, T., Mendes, T.A.O., Moreira, E.C., Silva, C.G.R., Brasil, B.S.A.F., Oliveira, C.S.F., Azevedo, V.A., Ortega, J.M., Leite,  
299 R.C., Haddad, J.P., 2017. Molecular typing of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo isolates from leptospirosis outbreaks in Brazilian  
300 livestock. *BMC Vet. Res.*, 13, 177. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1081-9>
- 301 Cunha, C.E.P., Felix, S.R., Seixas Neto, A.C.P., Campello-Felix, A., Kremer, F.S., Monte, L.G., Amaral, M.G., Nobre, M.O., Silva, E.F., Hartleben,  
302 C.P., McBride, A.J.A., Dellagostin, O.A., 2016. Infection with *Leptospira kirschneri* Serovar Mozdok: First Report from the Southern  
303 Hemisphere. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 94, 519–521. DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0505>

- 304 Delooz, L., Czaplicki, G., Gregoire, F., Dal Pozzo, F., Pez, F., Kodjo, A., Saegerman, C. 2017. Serogroups and genotypes of *Leptospira* spp. strains  
305 from bovine aborted fetuses. *Transbound Emerg Dis.* 1-8. DOI: <https://doi.org/10.1111/tbed.12643>
- 306 Desvars, A., Cardinale, E., Michault, A. 2011. Animal leptospirosis in small tropical areas. *Epidemiol. Infect.* 139,167–188. DOI:  
307 <https://doi.org/10.1017/S0950268810002074>
- 308 Dikken, H., Kmety, E. 1978. Serological typing methods of leptospires. *Methods Microbiol.*, 11, 259–307. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(08\)70493-8](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(08)70493-8)
- 309
- 310 Director, A., Penna, B., Hamond, C., Loureiro, A.P., Martins, G., Medeiros, M.A., Lilenbaum, W., 2014. Isolation of *Leptospira interrogans*  
311 Hardjoprajitno from vaginal fluid of a clinically healthy ewe suggests potential for venereal transmission. *J. Med. Microbiol.* 51, 1234-1236.  
312 DOI: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.065466-0>
- 313 Ellis, W.A., 2015. Animal leptospirosis. *Current topics. Microbiol. and Immunol.* 387, 99-137. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_6)
- 314 Faine, S., Adler, B., Bolin, C.A., Perolat, P., 1999. *Leptospira* and leptospirosis. Melbourne : MediSci. 272p.
- 315 Fenner, J.S., Anjum, M.F., Randall, L.P., Pritchard, G.C., Wu, G., Errington, J., Dalley, C.G., Woodward, M.J., 2010. Analysis of 16S rDNA  
316 sequences from pathogenic *Leptospira* serovars and use of single nucleotide polymorphisms for rapid speciation by D-HPLC. *Res Vet Sci.*  
317 89,48-57. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2009.12.014>
- 318 Feresu, S.B., Steigerwalt, A.G., Brenner, D. J. 1999. DNA relatedness of *Leptospira* strains isolated from beef cattle in Zimbabwe. *Int. J. System.*  
319 *Bacteriol.* 49, 1111-1117. DOI: <https://doi.org/10.1099/00207713-49-3-1111>
- 320 Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*  
321 41, 95-98. URI: <http://brownlab.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1.pdf>
- 322 Hamond, C., Martins, G., Bremont, S., Medeiros, M.A., Bourhy, P., Lilenbaum, W., 2016. Molecular Characterization and Serology of *Leptospira*  
323 *kirschneri* (Serogroup Grippotyphosa) isolated from Urine of a Mare Post-Abortion in Brazil. *Zoonoses Public Health.* 63, 191-195. DOI:  
324 <https://doi.org/10.1111/zph.12224>
- 325 Levett, P.N. Leptospirosis. 2001 *Clin Microbiol Rev.* 14:296–326. DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.14.2.296-326.2001>
- 326 Loureiro, A. P.; Hamond, C.; Pinto, P.; Bremont, S.; Bourhy, P.; Lilenbaum, W. 2016. Molecular analysis of leptospires from serogroup Sejroe  
327 obtained from asymptomatic cattle in Rio de Janeiro - Brazil reveals genetic proximity to serovar Guaricura. *Res. Vet. Sci.* v. 105, p. 249-253.  
328 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.02.012>
- 329 Majed, Z., Bellenger, E., Postic, D., Pourcel, C., Baranton, G., Picardeau, M., 2005. Identification of variable-number tandem-repeat loci in  
330 *Leptospira interrogans sensu stricto*. *J. Clin. Microbiol.* 43, 539-545. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.43.2.539-545.2005>
- 331 Martins, G., Loureiro, A.P., Hamond, C., Pinna, M.H., Bremont, S., Bourhy, P., Lilenbaum, W. 2015. First isolation of *Leptospira noguchii*  
332 serogroups Panama and Autumnalis from cattle. *Epidemiol Infect.* 143, 1538-1541. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0950268814002416>
- 333 Mascolli, R., 2001. Inquérito sorológico para leptospirose, doença de Lyme e leishmaniose em cães do município de Santana de Parnaíba, São Paulo.  
334 Colheitas efetuadas durante a campanha de vacinação anti-rábica, no ano de 1999. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e  
335 Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 140 p.
- 336 Mgode, G.F., Machang'u, R.S., Mhamphi, G.G., Katakweba, A., Mulungu, L.S., Durnez, L., Leirs, H., Hartskeerl, R.A., Belmain, S.R. 2015.  
337 *Leptospira* Serovars for Diagnosis of Leptospirosis in Humans and Animals in Africa: Common *Leptospira* Isolates and Reservoir Hosts. *PLoS*  
338 *Negl Trop Dis.* 9, 1-19. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004251>
- 339 Miraglia, F., Moraes, Z. M., Melville, P. A., Dias, R. A., Vasconcellos, S. A. 2009. EMJH medium with 5-fluorouracil and nalidixic acid associated  
340 with serial dilution technique used to recover *Leptospira* spp from experimentally contaminated bovine semen. *Braz. J. Microbiol.* 4, 189-193.  
341 DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822009000100033>

- 342 Moreira E.C. 1994. Avaliação de métodos para erradicação de leptospiroses em bovinos leiteiros. Tese de Doutorado, Escola de Veterinária,  
343 Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 93p
- 344 Niloofa, R., Fernando, N., De Silva, N. L., Karunanayake, L., Wickramasinghe, H., Dikmadugoda, N., Premawansa, G., Wickramasinghe, R., De  
345 Silva, H.J., Premawansa, S., Rajapakse, S., Handunnetti, S. 2015. Diagnosis of Leptospirosis: Comparison between Microscopic Agglutination  
346 Test, IgM-ELISA and IgM Rapid Immunochromatography Test. 10, 1-12. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129236>
- 347 Oliveira, M.A.A., Leal, É.A., Correia, M.A., Serufo Filho, J.C., Dias, R.S., Serufo, J.C. 2017. Human leptospirosis: occurrence of serovars of  
348 *Leptospira* spp. in the state of Minas Gerais, Brazil, from 2008 to 2012. Braz J Microbiol. 48, 483-488. DOI:  
349 <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.12.010>
- 350 Pinto, P. S., Pestana, C., Medeiros, M.A., Lilenbaum, W. 2017. Plurality of *Leptospira* strains on slaughtered animals suggest a broader concept of  
351 adaptability of leptospires to cattle. Acta Tropica. 172, 156-159. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.04.032>
- 352 Rocha, B.R., Narduche, L., Oliveira, C. S., Martins, G., Lilenbaum, W.. 2017. Molecular demonstration of intermittent shedding of *Leptospira* in  
353 cattle and sheep and its implications on control. Ciência Rural, 47, 1-4. DOI: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20170088>
- 354 Salaün, L., Mérien, F., Gurianova, S., Baranton, G., Picardeau, M., 2006. Application of multilocus variable-number tandem-repeat analysis for  
355 molecular typing of the agent of leptospirosis. J. Clin. Microbiol. 44, 3954-3962. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.00336-06>
- 356 Stoddard, R.A., Gee, J.E., Wilkins, P.P., McCaustland, K., Hoffmaster, A.R., 2009. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan  
357 polymerase chain reaction targeting the *LipL32* gene. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 64, 247-255. DOI:  
358 <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.03.014>
- 359 Sugunan, A.P., Natarajaseenivasan, K., Vijayachari, P., Sehgal, S.C. 2004. Percutaneous exposure resulting in laboratory-acquired leptospirosis—a  
360 case report. J. Med. Microbiol.. 53, 1259-1262. DOI: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45735-0>
- 361 Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol. Biol.  
362 Evol. 30, 2725-2729. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- 363 Tedesco, L.F., Manrique, G.L., Sulzer, C.R. 1969. A new leptospiral serotype in the Canicola serogroup from Argentina. Trop. Geogr. Med. 21, 203-  
364 206. PMID: 5799576
- 365 Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J. Bacteriol. 173, 697-703.  
366 URI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC207061/pdf/jbacter00092-0291.pdf>

## **CAPÍTULO IV**

**Emprego da estirpe *Leptospira kirschineri* sorogrupo Grippotyphosa isolada de bovino, no Triângulo Mineiro, no teste de Soroaglutinação Microscópica (MAT)**

**(Capítulo em formato de artigo científico para posterior submissão)**

1 **Emprego da estirpe *Leptospira kirschineri* sorogrupo Grippotyphosa isolada de bovino, no Triângulo Mineiro, no**  
2 **teste de Soroaglutinação Microscópica (MAT)**

3 Pollyanna M. Soares<sup>a\*</sup>, Dayane O. Gomes<sup>a</sup>, Fernando P. Macedo<sup>a</sup>, Mayara M. Soares<sup>a</sup>, Danilo M. Silva<sup>a</sup>, Laís M.  
4 Resende<sup>a</sup>, Karla R. Lemes<sup>a</sup>, Anna M. C. Lima<sup>a</sup>

5 <sup>a</sup> Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Laboratório de Doenças Infectocontagiosas, Universidade Federal  
6 de Uberlândia, Uberlândia - MG, Brasil.

7 \*Corresponding author - e-mail addresses: pollymafra@yahoo.com.br

8

9 **RESUMO**

10 A leptospirose é uma zoonose mundial que afeta animais domésticos, principalmente bovinos, causando  
11 grandes perdas econômicas através dos transtornos reprodutivos causados pela doença. O teste Soroaglutinação  
12 Microscópica (MAT), ainda é utilizado como diagnóstico de referência para leptospirose bovina a partir do emprego de  
13 estirpes de referência. Objetivou-se neste estudo avaliar a reatividade das amostras de soro sanguíneo de bovinos ao  
14 teste MAT a partir emprego de uma estirpe de *Leptospira* isolada em bovino no Triângulo Mineiro, adicionada ao  
15 painel de antígenos com estirpes de referência. Foram utilizadas 372 amostras de soro sanguíneo de bovinos no teste  
16 sorológico, empregando-se apenas estirpes de referência (MAT<sub>REF</sub>), 187/372 (50,26%) foram reagentes para pelo  
17 menos uma das estirpes de referência testadas, enquanto no teste com o emprego da estirpe isolada em bovino (MAT<sub>REF+ISO</sub>),  
18 196/372 (52,68%) foram reagentes para pelo menos uma das estirpes de referência e de isolado local testados,  
19 não havendo coaglutinações para um mesmo sorogrupo entre estirpe local e de referência. A inclusão de um isolado de  
20 estirpe local do sorogrupo Grippotyphosa no MAT revelou um aumento de 2,4% ( $p > 0,05$ ), não significativo do  
21 número de bovinos identificados como sororeativos. Portanto, conclui-se que a utilização de maior quantidade de  
22 isolados locais no painel de antígenos do MAT é necessária para aumentar a significância no número de animais  
23 reativos e conseqüentemente melhorar a sensibilidade do teste.

24 **Palavras-chave:** Estirpe autóctone. Leptospirose bovina. Grippotyphosa. Diagnóstico.

25

26 **1. INTRODUÇÃO**

27 A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial, causada por uma bactéria patogênica do gênero  
28 *Leptospira* spp. com formato em espiral e diâmetro de aproximadamente 0,15 a 0,30  $\mu\text{m}$ , que ocorre com maior  
29 frequência em ambientes com altos índices de temperatura e umidade e inadequadas condições sanitárias, permitindo a  
30 sobrevivência da bactéria no ambiente e favorecendo a sua disseminação pra várias espécies animais, inclusive o  
31 homem (Faine et al., 1999; Adler; Moctezuma, 2010; Fornazari et al., 2012; Picardeau, 2013).

32 Existem atualmente 23 genomoespécies de leptospiros que são divididas em três grupos, que compreende as  
33 patogênicas, não-patogênicas e intermediárias. Dentre as espécies patogênicas, são reportadas no mundo todo em ordem  
34 de importância, as espécies: *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. kirschneri*, *L. santarosai*, *L. noguchi*, além dessas,  
35 outras também pertencem ao mesmo grupo, tais como, *L. alexanderi*, *L. alstonii*, *L. kmetyi* e *L. weilii*. Dentre as  
36 diferentes espécies existem mais de 300 sorovares diferentes de leptospiros reconhecidos e estes estão distribuídos em  
37 28 sorogrupos (Levett, 2015; Puche et al., 2018).

38 A leptospirose é importante doença que afeta humanos, animais silvestres e domésticos, principalmente cães,  
39 bovinos e suínos (Adler; Moctezuma, 2010). Em bovinos, a doença ocorre de forma assintomática, em grande parte dos  
40 casos, quando é causada por sorovares adaptados ao hospedeiro, tais como Hardjoprajitno (*L. interrogans*) e  
41 Hardjobovis (*L. borgpetersenii*), de espécies geneticamente distintas, porém pertencentes ao mesmo sorogrupo Sejroe  
42 (Pinto et al., 2017). Porém, em alguns casos, os animais infectados pela *Leptospira* são propensos a abortos, geram  
43 recém-nascidos fracos, desenvolvem mastite e apresentam uma diminuição da taxa de crescimento, causando  
44 diminuição da produtividade e impactando diretamente a economia (Langoni et al., 1999; Adler; Moctezuma, 2010;  
45 Fornazari et al., 2012).

46 Em bovinos, a leptospirose em áreas tropicais é considerada endêmica, uma vez que nessas áreas existem  
47 muitos animais silvestres que podem albergar diferentes sorovares de *Leptospira*, tornando os bovinos mais expostos a  
48 um ambiente com alta carga de contaminação. Desta forma, nessas áreas podem circular muitos sorovares de acordo  
49 com cada região estudada (Gamage et al., 2014; Mgode et al., 2015; Hamond et al., 2016; Martins; Lilenbaum, 2017).

50 A Soroaglutinação Microscópica (MAT) é uma ferramenta de diagnóstico sorológico utilizado para a  
51 identificação de casos da doença em humanos e animais (Adler, 2015). Apesar de suas desvantagens, esta técnica ainda  
52 é considerada entre outros métodos sorológicos, um teste de referência, e consiste em avaliar a reatividade de anticorpos  
53 sanguíneos à antígenos vivos de *Leptospira* pertencentes à diversas espécies, sorogrupo e sorovares diferentes (OIE,  
54 2014).

55 Para uma melhor sensibilidade do teste, recomenda-se que o painel de antígenos utilizados deve ser  
56 representativo de todos os sorogrupos já detectados na região em que os animais são encontrados e, de preferência,  
57 estirpes representando todos os sorogrupos conhecidos (Faine et al., 1999; OIE, 2014).

58 Devido a ocorrência de infecções incidentais em bovinos, provocadas sorovares de *Leptospira* spp. oriundos de  
59 animais silvestres ou outras espécies domésticas, a inclusão de estirpes locais é sugerida para possibilitar a detecção de  
60 um grande número de animais sororeativos no teste MAT, embora as cepas de referência auxiliem na interpretação dos  
61 resultados entre laboratórios (OIE, 2014; Pinto et al., 2015).



62 No Brasil, poucos estudos abordaram a utilização de cepas autóctones no teste MAT, tais como, Araújo et al.  
63 (2005) que detectaram maior frequência de bovinos reagentes para o sorovar Hardjoprajitno (Norma) isolado em Minas  
64 Gerais, quando inserido no teste MAT e comparado com outros sorovares de referência; Sarmiento et al. (2012) que  
65 detectaram 6.0% de aumento da sensibilidade no MAT após a inclusão de estirpes locais, e Pinto et al. (2015) que  
66 constataram que o teste MAT apresentou um significativo aumento quando estirpes locais foram adicionadas ao painel  
67 de antígenos de estirpes de referência.

68 A maioria das estirpes de referência que compõe o painel de antígenos do teste MAT é oriunda de países com  
69 clima e fauna muito distintos do Brasil. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a reatividade das amostras  
70 de soro sanguíneo de bovinos ao teste MAT a partir emprego de duas estirpes de *Leptospira* isoladas em bovinos no  
71 Brasil, adicionada ao painel de antígenos de estirpes de referência.

72

## 73 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 74 2.1. Amostras

75 Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de  
76 Uberlândia (UFU) sob nº de protocolo 018/16.

77 Foram coletadas 372 amostras de sangue de bovinos livres de sinais clínicos de leptospirose no exame ante-  
78 mortem, abatidos no estado de Minas Gerais, provenientes das regiões do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba. As  
79 amostras foram encaminhadas para o laboratório, submetidas à centrifugação para obtenção do soro sanguíneo,  
80 aliquotadas, identificadas e estocadas à temperatura de -20°C para posterior utilização no MAT.

81

### 82 2.2. Teste de soroaglutinação microscópica (MAT)

83 Foram realizados os testes MAT de triagem e titulação de acordo com Faine et al. (1999), utilizando-se 22  
84 estirpes de *Leptospira* de referência (MAT<sub>REF</sub>) escolhidas para formação do painel de antígenos foi composta pelos  
85 sorovares Australis (estirpe Ballico), Autumnalis (estirpe Akiyami A), Bataviae (cepa Van Tienen), Bratislava (cepa  
86 JezBratislava), Canicola (estirpe Hond Utrecht), Castellonis (estirpe Castellon 3), Copenhageni (estirpe M20),  
87 Cynopteri (estirpe 3522C), Djasiman (estirpe Djasiman), Guaricura (cepa Guaricura), Grippotyphosa (Estirpe Moskva  
88 V), Hardjobovis (estirpe Sponselee), Hardjoprajitno (estirpe OMS), Hebdomadis (estirpe Hebdomadis),  
89 Icterohaemorrhagiae (estirpe Verdun), Javanica (estirpe Javanica), Panama (estirpe CZ 214K), Pomona (estirpe  
90 Pomona), Sejroe (estirpe M84), Shermani (estirpe 1342K), Tarassovi (estirpe Pere-pelitsin) e Wolffii (estirpe 3705),  
91 cedidas pelo Laboratório de Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal Fluminense (UFF).

92 Adicionalmente, uma estirpe local, denominada UFU02 (*L. kirschneri* sorogrupo Grippytyphosa), isolada da  
93 urina de bovino na região do Triângulo Mineiro, foi incluída ao painel de antígenos das estirpes de referência (MAT  
94 <sub>REF+ISO</sub>). Essas culturas foram repicadas semanalmente em meio EMJH (DIFCO®, EUA), suplementadas com 10% de  
95 soro de coelho estéril, e estocadas a 30°C.

96 Verificou-se primeiramente a reatividade das amostras de soro sanguíneo às estirpes de *Leptospira* pelo teste  
97 de triagem MAT um título de 100. As amostras positivas na triagem, cujo campo microscópico apresentou 50% ou mais  
98 de leptospiplas aglutinadas, foram encaminhadas para o teste de titulação nas diluições de 1:200 a 1:3200. O título do  
99 soro foi a recíproca da diluição das amostras de maior diluição que apresentou resultado positivo.

100 Foi considerado como mais provável o sorogrupo com maior título, portanto quando um animal apresentava-se  
101 reagente em título mais elevado idêntico para dois ou mais sorogrupos, o mesmo foi retirado da análise (Vasconcellos et  
102 al. 1997; Sarmiento et al., 2012). Além disso, foram consideradas também as coaglutinações quando ocorridas reações  
103 entre a estirpe local e a estirpe de referência que pertenciam ao mesmo sorogrupo, independente do título obtido no teste  
104 MAT, prevalecendo na análise a amostra reagente ao sorogrupo de referência, conforme Pinto et al. (2015).

105

### 106 2.3. Análise estatística

107 A comparação dos resultados obtidos nos testes MAT <sub>REF</sub> e MAT <sub>REF+ISO</sub> foi realizada por estatística descritiva  
108 pelo teste de McNemar (nível de significância de  $p < 0.05$ ), utilizando-se o programa Bioestat versão 5.0 (Ayres et al.,  
109 2007).

110

## 111 3. RESULTADOS

112 No MAT <sub>REF</sub>, 187/372 (50,26%) foram reagentes para pelo menos uma das estirpes de referência testadas,  
113 enquanto MAT <sub>REF+ISO</sub>, 196/372 (52,68%) foram reagentes para pelo menos uma das estirpes de referência e de isolado  
114 local testados, conforme Tabela 1.

115 Considerando as coaglutinações quando um animal apresentava-se reagente em título mais elevado idêntico  
116 para dois ou mais sorogrupos, houve 76 coaglutinações, que ocorreram principalmente entre os sorogrupos Sejroe,  
117 Tarassovi, Canicola, Castellonis, Hebdomadis e Icterohaemorrhagiae, variando entre títulos de 100 a 1.800. Não foi  
118 observada nenhuma ocorrência quanto às coaglutinações para o mesmo sorogrupo da estirpe local e da estirpe de  
119 referência.

120 No MAT <sub>REF</sub>, os bovinos foram sororeativos para os sorogrupos Tarassovi (29%), Sejroe (14%), Hebdomadis  
121 (4%), Icterohaemorrhagiae (1,1%), Canicola (0,8%), Ballum (0,5%), Pomona (0,5%), e Djasiman (0,3%). Já no teste  
122 MAT <sub>REF+ISO</sub>, os resultados foram semelhantes ao MAT <sub>REF</sub>, com exceção do sorogrupo Grippytyphosa, sendo 9/372

123 (2,4%) bovinos sororeagentes à estirpe UFU02. No MAT<sub>REF+ISO</sub>, a inclusão do isolado no painel de antígenos levou a  
 124 um aumento da sororeatividade de 2,4%, porém não foi significativo ( $p = 0,5997$ , teste de McNemar).

125

126 **Tabela 1.** Resultados dos MAT<sub>REF</sub> e MAT<sub>REF+ISO</sub> por sorogrupo e títulos de anticorpos anti-*Leptospira* em bovinos  
 127 sororeagentes abatidos no Triângulo Mineiro, Minas Gerais, 2018.

| Sorogrupo<br>MAT <sub>REF</sub> | Títulos |     |     |     |      |      | Total | Sorogrupo<br>MAT <sub>REF+ISSO</sub> | Títulos |     |     |     |      |      | Total |
|---------------------------------|---------|-----|-----|-----|------|------|-------|--------------------------------------|---------|-----|-----|-----|------|------|-------|
|                                 | 100     | 200 | 400 | 800 | 1600 | 3200 |       |                                      | 100     | 200 | 400 | 800 | 1600 | 3200 |       |
| A                               | 0       | 0   | 0   | 0   | 0    | 0    | 0     | A                                    | 0       | 0   | 0   | 0   | 0    | 0    | 0     |
| B                               | 0       | 0   | 0   | 0   | 0    | 0    | 0     | B                                    | 0       | 0   | 0   | 0   | 0    | 0    | 0     |
| C                               | 0       | 0   | 0   | 0   | 0    | 0    | 0     | C                                    | 0       | 0   | 0   | 0   | 0    | 0    | 0     |
| D                               | 0       | 1   | 0   | 1   | 1    | 0    | 3     | D                                    | 0       | 1   | 0   | 1   | 1    | 0    | 3     |
| E                               | 1       | 0   | 0   | 1   | 0    | 0    | 2     | E                                    | 1       | 0   | 0   | 1   | 0    | 0    | 2     |
| F                               | 0       | 0   | 0   | 2   | 2    | 0    | 4     | F                                    | 0       | 0   | 0   | 2   | 2    | 0    | 4     |
| G                               | 0       | 0   | 0   | 0   | 0    | 0    | 0     | G                                    | 0       | 0   | 0   | 0   | 0    | 0    | 0     |
| H                               | 1       | 0   | 0   | 0   | 0    | 0    | 1     | H                                    | 1       | 0   | 0   | 0   | 0    | 0    | 1     |
| I                               | 29      | 11  | 7   | 4   | 1    | 0    | 52    | I                                    | 29      | 11  | 7   | 4   | 1    | 0    | 52    |
| J                               | 0       | 0   | 0   | 0   | 0    | 0    | 0     | J                                    | 5       | 4   | 0   | 0   | 0    | 0    | 9     |
| K                               | 12      | 2   | 1   | 0   | 0    | 0    | 15    | K                                    | 12      | 2   | 1   | 0   | 0    | 0    | 15    |
| L                               | 0       | 0   | 0   | 0   | 0    | 0    | 0     | L                                    | 0       | 0   | 0   | 0   | 0    | 0    | 0     |
| M                               | 0       | 0   | 0   | 0   | 0    | 0    | 0     | M                                    | 0       | 0   | 0   | 0   | 0    | 0    | 0     |
| N                               | 2       | 0   | 0   | 0   | 0    | 0    | 2     | N                                    | 2       | 0   | 0   | 0   | 0    | 0    | 2     |
| O                               | 0       | 0   | 0   | 0   | 0    | 0    | 0     | O                                    | 0       | 0   | 0   | 0   | 0    | 0    | 0     |
| P                               | 25      | 50  | 20  | 9   | 1    | 3    | 108   | P                                    | 25      | 50  | 20  | 9   | 1    | 3    | 108   |
| <b>Total</b>                    | 70      | 64  | 28  | 17  | 5    | 3    | 187   | <b>Total</b>                         | 75      | 68  | 28  | 17  | 5    | 3    | 196   |

128 Legenda: A (Australis), B (Autuminalis), C (Batavie), D (Canicola), E (Ballum), F (Icterohaemorrhagiae), G (Cynopteri), H  
 129 (Djasiman), I (Sejroe), J (Grippotyphosa), K (Hebdomadis), L (Javanica), M (Panama), N (Pomona), O (Shermani), P (Tarassovi)

130

131 Dos bovinos testados para a estirpe local UFU02, nove foram sororeagentes ao teste MAT<sub>REF+ISO</sub>,  
 132 apresentando títulos entre 100 e 200 (Tabela 1). Estes bovinos eram provenientes de quatro municípios do Triângulo  
 133 Mineiro, tais como, Frutal (4/9 – 44,4%), Santa Vitória (2/9 – 22,2%), Uberlândia (2/9 – 22,2%) e Veríssimo (1/9 –  
 134 11,1%). A estirpe UFU02 foi isolada da urina de um dos bovinos provenientes do município de Frutal, o qual reagiu no  
 135 teste MAT a um título de 200 para a estirpe isolada.

136

#### 137 4. DISCUSSÃO

138 A sororreatividade dos bovinos ao teste MAT com estirpes de referência e isolados locais nesse estudo foi  
 139 elevada (52,68%), assim como os estudos de Sarmento et al. (2012) e Pinto et al. (2015), que encontraram em bovinos  
 140 uma sororreatividade de 65,17% e 65%, respectivamente. Em Minas Gerais, Sarmento et al. (2012) encontraram uma  
 141 sororreatividade de 66,44%, sendo considerada maior em relação ao presente estudo.

142 Por terem sido coletadas de bovinos destinados ao abate e sem alterações ante-mortem, não era esperado que  
143 houvesse uma alta sororeatividade das amostras de soro sanguíneo desses bovinos aos testes sorológicos realizados. Tal  
144 achado também foi encontrado no trabalho de Pinto et al. (2017), que avaliaram bovinos, sem sinais clínicos aparentes e  
145 detectaram no isolamento 19 estirpes de *Leptospira* obtidos de urina e fluido vaginal, pertencentes a 3 espécies (*L.*  
146 *santarosai*, *L. alstonii* e *L. interrogans*) e 5 sorogrupos diferentes (Sarmin, Tarassovi, Shermani, Grippytyphosa e  
147 Sejroe).

148 As leptospiras patogênicas encontram-se disseminadas no ambiente, o que permite a manutenção dessas  
149 bactérias nos rins de muitos hospedeiros silvestres e domésticos. O ciclo de vida da leptospira envolve a sua eliminação  
150 através da urina do hospedeiro, a sua persistência no ambiente, a aquisição de novos hospedeiros e a sua disseminação  
151 via sanguínea para os rins através dos glomérulos ou capilares peritubulares, alcançando e colonizando o epitélio da  
152 parede do túbulo renal proximal, de forma a possibilitar sua eliminação pela urina por longos períodos sem causar danos  
153 significativos aos hospedeiros reservatórios (Haake; Levett, 2015).

154 Nos testes MAT<sub>REF</sub> e MAT<sub>REF+ISO</sub>, os bovinos apresentaram maior reatividade para os sorogrupos Tarassovi,  
155 Sejroe e Hebdomadis, tais achados corroboram em partes com os de Sarmento et al. (2012) e Cosate et al. (2017), que  
156 no estado de Minas Gerais, encontraram o Sejroe como sorogrupo mais reagente, considerado o mais frequente  
157 causador de leptospirose bovina na América Latina, segundo Pinto et al. (2016). Quanto ao sorogrupo Tarassovi,  
158 chama-se atenção para os altos títulos de anticorpos anti-*Leptospira*, indicando o bovino como hospedeiro incidental e  
159 possível reservatório deste sorogrupo, discordando de Pinto et al. (2016), uma vez que os bovinos podem albergar  
160 novos sorogrupos de *Leptospira* e transmiti-los para outros animais do rebanho, animais silvestres e inclusive o homem.

161 Pinto et al. (2017) detectaram que 57,9% dos isolados obtidos de urina e fluido vaginal de bovinos não faziam  
162 parte do sorogrupo Sejroe, demonstrando que essa espécie pode hospedar uma ampla variedade de sorogrupos e que o  
163 mecanismo de adaptação dessas estirpes de leptospiras aos bovinos ainda é desconhecido, devendo-se considerar este  
164 aspecto no estudo epidemiológico e nas formas de controle da doença.

165 A única diferença visualizada entre os testes sorológicos MAT<sub>REF</sub> e MAT<sub>REF+ISO</sub> foi a reatividade dos bovinos  
166 para o isolado UFU02 no teste MAT<sub>REF+ISO</sub>. Acredita-se que esta reação tenha ocorrido por se tratar de estirpes  
167 diferentes do sorogrupo Grippytyphosa, uma vez que apresentam características moleculares diferentes, principalmente  
168 quanto ao perfil de *Variable-Number Tandem-Repeat* (VNTR), conforme Tabela 2.

169 A estirpe local pertencente ao sorogrupo Grippytyphosa, incluída no painel de antígenos do MAT, foi isolada  
170 de um bovino criado em sistema de confinamento na região do Triângulo Mineiro, mostrando ter uma sororeatividade  
171 significativa dos bovinos desta região à esta estirpe. Sarmento et al. (2012) e Pinto et al. (2015) também verificaram a  
172 sororeatividade dos bovinos a este sorogrupo. No estudo de Pinto et al. (2015) a estirpe pertencente ao sorogrupo

173 Grippotyphosa, isolado de caprinos, apresentou maior antigenicidade, detectando mais animais quando comparada a  
 174 estirpe de referência do mesmo sorogrupo, que foi isolada de humanos; enquanto que no estudo de Sarmiento et al.  
 175 (2012), os bovinos mostraram pouca sororeatividade para as estirpes do sorogrupo Grippotyphosa, isoladas de  
 176 capivaras, porém a existência da reação à estirpes isoladas em espécies silvestres também mostrou a sua importância,  
 177 uma vez que os bovinos mostraram-se reagentes à elas, indicando o contato dessa espécie com animais silvestres.

178 Em outros países, Méndez et al. (2013), também detectaram maior reatividade de bovinos no teste MAT à  
 179 estirpe local H89 pertencente ao grupo Sejroe, quando comparada a estirpe de referência do mesmo sorogrupo isolada  
 180 de humanos; e Mgode et al. (2005) detectaram um aumento da prevalência da leptospitose em roedores de 1,9% para  
 181 16,9% e em humanos de 0,26% para 10,75%, quando sorovares locais foram incuídos no teste MAT.

182

183 **Tabela 2.** Perfil de VNTR das estirpes pertencentes ao sorogrupo Grippotyphosa utilizadas nos MAT<sub>REF</sub> e MAT<sub>REF+ISO</sub>.

| Espécie                      | Sorogrupo     | Estirpe | País   | Fonte de<br>isolamento | Perfil de VNTR |      |      | Referência              |
|------------------------------|---------------|---------|--------|------------------------|----------------|------|------|-------------------------|
|                              |               |         |        |                        | VNTR           | VNTR | VNTR |                         |
|                              |               |         |        |                        | 4              | 7    | 10   |                         |
| <i>Leptospira kirschneri</i> | Grippotyphosa | MoskaV  | Rússia | Humano                 | 3              | 2    | 11   | Salaüm et al.<br>(2006) |
| <i>Leptospira kirschneri</i> | Grippotyphosa | UFU02   | Brasil | Bovino                 | 2              | 14   | 10   | Soares et al.<br>(2018) |

184

185 No presente estudo, utilizou-se apenas uma estirpe de isolado local, encontrando-se um aumento não  
 186 significativo na reatividade dos bovinos no teste MAT. Tal fato demonstra a necessidade da maior utilização de estirpes  
 187 locais, isoladas em bovinos ou em outras espécies animais que podem estar em contato com bovinos, no MAT para  
 188 aumentar significativamente a o número de animais reativos ao teste, e consequentemente melhorar a sua sensibilidade.

189 É importante destacar que isolados locais obtidos de outras espécies, domésticas ou silvestres, com exceção da  
 190 bovina, também devem ser utilizados no painel de antígenos do MAT, uma vez que Kremer et al. (2016), já detectaram  
 191 estirpes características de animais silvestres em bovinos e que muito sobre a epidemiologia da doença em bovinos ainda  
 192 é desconhecido.

193 A sororreatividade de nove bovinos à estirpe UFU02 foi outro achado importante neste estudo, pois quatro  
 194 deles eram mantidos em confinamento na mesma prodriedade do município de Frutal, sendo que um reagiu a um título  
 195 de 200 no teste MAT<sub>REF+ISO</sub>, do qual foi isolada a estirpe Mafrutal, e quanto aos outros três animais, um reagiu a um  
 196 título de 100 e dois reagiram a um título de 200 no teste MAT<sub>REF+ISO</sub>. Tal achado indica que o animal, cuja estirpe foi

197 isolada, teve contato com a estirpe de *Leptospira kirschneri* sorogrupo Grippotyphosa no ambiente, e que  
198 provavelmente foi transmitida direta ou indiretamente por espécies silvestres que podem ter invadido o local onde os  
199 bovinos confinados eram criados a procura de alimentos, ou por contato direto ou indireto com a bactéria da urina dos  
200 outros bovinos confinados.

201 A infecção por leptospiros ocorre com mais frequência através das mucosas ocular, oral, nasal ou aparelho  
202 genital. Após a entrada da *Leptospira* no corpo do animal o período de bacteremia, que começa 1 ou 2 dias pós-  
203 infecção, pode durar uma semana, terminando com a instalação de leptospiros principalmente nos rins e com o  
204 aparecimento de anticorpos circulantes. As aglutininas anti-leptospira são detectáveis geralmente, após 10-14 dias da  
205 fase bacterêmica e atinge níveis máximos, que variam entre 1.000 a 100.000 no MAT, por cerca de 3-6 semanas.  
206 Dependendo da espécie, após a ocorrência de os altos títulos pode ocorrer um declínio gradual, sendo que os títulos  
207 baixos podem ser detectados por vários anos em muitas espécies animais (Ellis, 2015).

208 Desta forma, pôde-se constatar nesse estudo, que os bovinos reagentes à estirpe UFU02, apesar dos baixos  
209 títulos no MAT e de não apresentar nenhum sinal clínico da doença no exame ante-mortem, eliminam *Leptospira* via  
210 urina no ambiente, demonstrando a ocorrência de processo infeccioso causado pela estirpe isolada.

211 Portanto, o estudo da leptospirose em biomas diferentes é muito importante para o conhecimento dos aspectos  
212 epidemiológicos da *Leptospira*, principalmente quanto ao pH do solo, a pluviometria e a disponibilidade de água que  
213 tem um impacto direto na sobrevivência dos leptospiros no meio ambiente (Andre-Fontaine et al. 2015; Correia;  
214 Loureiro; Lilenbaum, 2017), tornando alguns biomas potencialmente estratégicos do que outros para a sobrevivência e  
215 manutenção da *Leptospira*, inclusive os biomas da América latina, nos quais a infecção por leptospira é amplamente  
216 distribuída (Vieira; Pinto; Lilenbaum, 2018).

217 O Triângulo Mineiro está inserido no Cerrado Brasileiro, um dos biomas da América Latina que possui boas  
218 condições ambientais de temperatura e umidade para a sobrevivência da *Leptospira*, tornando esta bactéria viável no  
219 ambiente e possibilitando a transmissão da doença para bovinos e outras espécies domésticas e silvestres.

220 Neste contexto, vale salientar que os laboratórios que realizam o MAT para o diagnóstico de leptospirose,  
221 necessitam atualizar o painel de antígenos utilizados neste teste, adicionando com periodicidade às cepas de referências,  
222 estirpes de isolados locais conforme pesquisas realizadas na região em que estão inseridos.

223

## 224 5. CONCLUSÃO

225 A inclusão da estirpe local do sorogrupo Grippotyphosa no teste de soroaglutinação microscópica aplicado ao  
226 diagnóstico da leptospirose bovina revelou um aumento não significativo do número de bovinos identificados como

227 sororeativos, portanto a utilização de maior quantidade de isolados locais no painel de antígenos do MAT é necessária  
 228 para aumentar a significância no número de animais reativos e sensibilidade do teste.

229

## 230 6. REFERÊNCIAS

- 231 Adler, B., Moctezuma, A.P., 2010. Leptospira and leptospirosis. *Vet. Microbiol.* 140, 287–296. DOI:  
 232 <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.012>
- 233 Adler, B., 2015. *Current Topics in Microbiology and Immunology: Leptospira and Leptospirosis*. Springer Berlin Heidelberg:  
 234 Germany. 295p.
- 235 Andre-Fontaine, G., Aviat, F., Thorin C. 2015. Waterborne leptospirosis: Survival and preservation of the virulence of pathogenic  
 236 *Leptospira* spp. in fresh water. *Curr. Microbiol.*71(1), 136–42. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0836-4>
- 237 Araújo, V. E. M.; Moreira, E. C.; Navega, L. A. B.; Silva, J. A.; Contreras, R. L. 2005. Frequência de aglutininas anti-*Leptospira*  
 238 interrogans em soros sanguíneos de bovinos, em Minas Gerais, de 1980 a 2002. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 57, 430-435.  
 239 DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-09352005000400002>
- 240 Ayres, M., Ayres Jr, M., Ayres, D. L., Santos, A. A. S. 2007. *Bioestat 5.0 aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e*  
 241 *médicas*. Belém: IDSM, 364p.
- 242 Correia, L., Loureiro, A.P., Lilenbaum, V., 2017. Effects of rainfall on incidental and host-maintained leptospiral infections in cattle  
 243 in a tropical region. *Vet. J.* 220, 63–64. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.12.016>
- 244 Cosate, M.R.V., Sakamoto, T., Mendes, T.A.O., Moreira, E.C., Silva, C.G.R., Brasil, B.S.A.F., Oliveira, C.S.F., Azevedo, V.A.,  
 245 Ortega, J.M., Leite, R.C., Haddad, J.P., 2017. Molecular typing of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo isolates from  
 246 leptospirosis outbreaks in Brazilian livestock. *BMC Vet. Res.*, 13, 177. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1081-9>
- 247 Ellis, W. A. 2015. Animal leptospirosis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 387, 99–137. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-662-](https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_6)  
 248 [45059-8\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_6)
- 249 Faine, S., Adler, B., Bolin, C.A., Perolat, P., 1999. *Leptospira and leptospirosis*. Melbourne : MediSci. 272p.
- 250 Fornazari, F., da Silva, R.C., Richini-Pereira, V.B., Beserra, H.E., Luvizotto, M.C., Langoni, H., 2012. Comparison of conventional  
 251 PCR, quantitative PCR, bacteriological culture and the Warthin Starry technique to detect *Leptospira* spp. in kidney and liver  
 252 samples from naturally infected sheep from Brazil. *J. Microbiol. Methods* 90, 321–326. DOI:  
 253 <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.06.005>
- 254 Gamage, C.D., Koizumi, N., Perera, A.K., Muto, M., Nwafor-Okoli, C., Ranasinghe, S., Kularatne, S.A., Rajapakse, R.P., Kanda, K.,  
 255 Lee, R.B., Obayashi, Y., Ohnishi, M., Tamashiro H., 2014. Carrier status of leptospirosis among cattle in Sri Lanka: a zoonotic  
 256 threat to public health. *Transbound. Emerg. Dis.* 61, 91-96. DOI: <https://doi.org/10.1111/tbed.12014>
- 257 Haake, D.A., Levett, P.N. 2015. Leptospirosis in Humans. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 387: 65–97. DOI:  
 258 <https://doi.org/10.1128/IAI.68.4.2276-2285.2000>

- 259 Hamond, C., Pestana, C.P., Medeiros, M.A., Lilenbaum, W., 2016. Genotyping of *Leptospira* directly in urine samples of cattle  
260 demonstrates a diversity of species and strains in Brazil. *Epidemiol. Infect.* 144, 72-75. DOI:  
261 <https://doi.org/10.1017/S0950268815001363>
- 262 Kremer, F.S., Esalabão, M.R., Jorge, S., Oliveira, N.R., Labonde, J., Santos, M.N.P., Monte, L.G., Grassmann, A.A., Cunha, C.E.P.,  
263 Forster, K.M., Moreno, L.Z., Moreno, A.M., Campos, V.F., McBride, A.JA., Pinto, L.S., Dellagostin, O.A. 2016. Draft genome  
264 of the *Leptospira interrogans* strains, Acegua, RCA, Prea, and Capivara, obtained from wildlife maintenance hosts and infected  
265 domestic animals. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 111, 280–283. DOI: <https://doi.org/10.1590/0074-02760160010>
- 266 Levett, P.N. 2015. Systematics of leptospiroaceae. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 387, 11-20. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3->  
267 [662-45059-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_2)
- 268 Martins, G., Lilenbaum, W. 2017. Control of bovine leptospirosis: Aspects for consideration in a tropical environment. *Res.Vet. Sci.*  
269 112, 156-160. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.03.021>
- 270 Méndez, C., Benavides, L., Esquivel, A., Aldama, A., Torres, D., Gavaldón, D., Melén-dez, P., Moles, L., 2013. Pesquisa serológica  
271 de *Leptospira* en roedores silvestres,bovinos, equinos y caninos en el noreste de México. *Rev. Salud Anim.* 35, 25–32. URI:  
272 <http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v35n1/rsa04113.pdf>
- 273 Mgode, G.F., Machang’u, R.S., Mhamphi, G.G., Katakweba , A., Mulungu, L.S., Durnez, L., Leirs, H., Hartskeerl, R.A., Belmain,  
274 S.R. 2015. *Leptospira* Serovars for Diagnosis of Leptospirosis in Humans and Animals in Africa: Common *Leptospira* Isolates  
275 and Reservoir Hosts. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, 1-19. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004251>
- 276 OIE, 2014. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.* World Organization for Animal Health, Paris.
- 277 Picardeau, M., 2013. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Méd. MaladiesInfect.* 43, 1–9. DOI:  
278 <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2012.11.005>
- 279 Pinto, P.S., Loureiro, A.P., Penna, B., Lilenbaum , W. 2015. Usage of *Leptospira* spp. local strains as antigens increases the  
280 sensitivity of the serodiagnosis of bovine leptospirosis. *Acta Tropica.* 149, 163-167. DOI:  
281 <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.05.008>
- 282 Pinto, P.da S., Libonati, H., Penna, B., Lilenbaum, W., 2016. A systematic review on the microscopic agglutination test  
283 seroepidemiology of bovine leptospirosis in Latin America. *Trop. Anim. Health Prod.* 48, 239-248. DOI:  
284 <https://doi.org/10.1007/s11250-015-0954-9>
- 285 Pinto, P. S., Pestana, C., Medeiros, M.A., Lilenbaum, W. 2017. Plurality of *Leptospira* strains on slaughtered animals suggest a  
286 broader concept of adaptability of leptospires to cattle. *Acta Tropica.* 172, 156-159. DOI:  
287 <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.04.032>
- 288 Puche, R., Ferrés, I., Caraballo, L., Rangel, Y., Picardeau, M., Takiff, H., Iraola, G. 2018. *Leptospira venezuelensis* sp. nov., a new  
289 member of the intermediate group isolated from rodents, cattle and humans. *Int J Syst Evol Microbiol.* 68, 513–517. DOI:  
290 <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002528>
- 291 Salaün, L., Mérien. F., Gurianova, S., Baranton, G., Picardeau, M., 2006. Application of multilocus variable-number tandem-repeat  
292 analysis for molecular typing of the agent of leptospirosis. *J. Clin. Microbiol.*44, 3954-3962. DOI:  
293 <https://doi.org/10.1128/JCM.00336-06>



- 294 Sarmiento, A.M.C., Azevedo, S.S., Morais, Z.M., Souza, G.O., Oliveira, F.C.S., Gonçalves, A.P., Miraglia, F., Vasconcellos, S.A.,  
295 2012. Use of *Leptospira* spp. strains isolated in Brazil in the microscopic agglutination test applied to diagnosis of  
296 leptospirosis in cattle herds in eight Brazilian states. *Pesqui. Vet. Bras.* 32, 601–606. DOI: [https://doi.org/10.1590/S0100-](https://doi.org/10.1590/S0100-736X2012000700003)  
297 [736X2012000700003](https://doi.org/10.1590/S0100-736X2012000700003)
- 298 Vasconcellos, S.A., Barbarini Júnior, O., Umehara, O., Morais, Z.M., Cortez, A., Pinheiro, S.R., Ferreira, F., Fávero A.C.M., Ferreira  
299 Neto, J.S. 1997. Leptospirose bovina. Níveis de ocorrência e sorotipos predominantes em rebanhos dos Estados de Minas  
300 Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul, no período de janeiro a abril de 1996.  
301 *Arqs Inst. Biológico, São Paulo*, 64, 7-15.
- 302 Vieira, A. S.; Pinto, P. S.; Lilenbaum, W. 2018. A systematic review of leptospirosis on wild animals in Latin America. *Trop. Anim.*  
303 *Health. Prod.* 50, p. 229-238. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11250-017-1429-y>
- 304
- 305
- 306
- 307

## **CAPÍTULO V**

### **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

## CAPÍTULO V – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que:

- A leptospirose está presente nos rebanhos bovinos do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, sendo os sorogrupos Serjoe; Tarassovi e Hebdomadis os mais frequentes;
- Muitos sorovares presentes nas vacinas comercializadas no Brasil têm pouca importância epidemiológica, e muitos dos que estão ausentes nessas vacinas causam infecções no rebanho bovino brasileiro, portanto o uso de isolados locais e sorovares que realmente acontecem no rebanho são importantes para o controle mais eficiente da leptospirose no rebanho bovino;
- Os testes de sorogrupagem e moleculares foram capazes de identificar a patogenicidade, a espécie e o sorogrupo da estirpe isolada neste estudo, porém foram encontradas dificuldades no momento da interpretação dos resultados, uma vez que os a caracterização sorológica apresentou diferença com a caracterização molecular;
- A estirpe de *Leptospira kirschineri* sorogrupo Grippytyphosa, denominada UFU02, foi a primeira a ser isolada em bovinos no Brasil, mostrando ter uma caracterização de VNTR diferente das outras estirpes deste sorogrupo já oficialmente descritas.
- Estirpes isoladas de *Leptospira* em bovinos podem estar associadas com a transmissão da leptospirose por contato direto ou indireto com espécies silvestres ou com outros bovinos infectados;
- O uso da estirpe isolada neste estudo no teste de Soroaglutinação Microscópica (MAT), não foi capaz aumentar, significativamente, a quantidade de bovinos reagentes, sugerindo-se uma maior utilização de estirpes locais no painel de antígenos do MAT;
- Os resultados de sorologia, isolamento e caracterização, tornou possível a revisão e atualização de alguns aspectos da leptospirose bovina, bem como da sua situação epidemiológica no Brasil;
- Mesmo este estudo tendo proporcionado um conhecimento extra sobre a leptospirose em bovinos no Brasil, outros estudos com inquéritos sorológicos, isolamentos e caracterização de *Leptospiras*, bem como uso de estirpes locais no teste de soroaglutinação microscópica, são necessários para chamar a atenção das autoridades brasileiras ligadas à Defesa Sanitária Animal e à Saúde Pública sobre os métodos diagnósticos que estão sendo utilizados para o diagnóstico da doença, bem como os métodos profiláticos;

- Poucos incentivos financeiros estão sendo oferecidos para pesquisas de tamanha importância sanitária em âmbito nacional, uma vez que os discentes e pesquisadores ligados aos sistemas de pós-graduação de instituições públicas brasileiras estão custeando suas próprias pesquisas, o que inviabiliza a realização de experimentos com custos mais elevados e que poderiam ter resultados mais efetivos.

## **ANEXOS**



Universidade Federal de Uberlândia  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)  
Rua Ceará, S/N - Bloco 2T, sala 113 – CEP 38405-315  
Campus Umuarama – Uberlândia/MG – Ramal (VoIP) 3423;  
e-mail: [ceua@propp.ufu.br](mailto:ceua@propp.ufu.br), [www.comissoes.propp.ufu.br](http://www.comissoes.propp.ufu.br)

**ANÁLISE FINAL Nº 050/16 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 018/16**

Projeto Pesquisa: "Isolamento de *Leptospira* spp. de bovinos na região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba."

Pesquisador Responsável: Anna Monteiro Correia Lima.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

**SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.**

**OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.**

Uberlândia, 18 de abril de 2016.

Prof. Dr. César Augusto Garcia  
Coordenador da CEUA/UFU