

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

**Isolamento de leptospiras em bovinos abatidos em
frigoríficos de Pelotas/RS**

Amilton Clair Pinto Seixas Neto

Pelotas, 2012

AMILTON CLAIR PINTO SEIXAS NETO

Isolamento de leptospiras em bovinos abatidos em frigoríficos de Pelotas/RS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Veterinária Preventiva).

Orientador: Éverton Fagonde da Silva

Co-Orientador: Odir Antônio Dellagostin

Pelotas, 2012

Banca examinadora:

Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva (Orientador) – FV/UFPeI

Prof. Dra. Márcia de Oliveira Nobre – FV/UFPeI

Prof. Dra. Flávia Aleixo Vasconcellos – CCQFA/UFPeI

Dr. Marco Alberto Medeiros – BioManguinhos - FIOCRUZ/RJ

*Dedico esse trabalho aos meus avós,
Amilton Seixas e Dalva Kommling e
minha mãe Tanise Seixas.*

Agradecimentos

A Deus em primeiro lugar, que sempre esteve ao meu lado.

A Universidade Federal de Pelotas, ao PPGV e ao CNPq, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva, pela confiança, amizade e ensinamentos.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Odir Dellagostin, pela amizade, competência e suporte.

A minha namorada e amiga Ellen Souza, por todo amor e companheirismo nos momentos de conquistas e perdas, e por sempre me incentivar acreditando em meu potencial.

Aos meus pais pelo carinho e incentivo, aos meus tios, em especial a minha tia Fabiana Seixas e o tio Tiago Collares que me apoiaram em todas as etapas de minha formação sempre com palavras sábias.

Ao meu sogro Vanderlei Souza e minha sogra Elgi Alice pelo apoio e amizade.

Aos meus amigos e colegas de laboratório de Vacinologia, André Alex, Samuel, Juliana, Thais, Karina, Carol, Ariana, Nathiele, Daiane e especialmente ao, Michel, pelo apoio, incentivo e amizade.

Aos demais colegas do laboratório de Vacinologia (Laboratório 7), estagiários e amigos do Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), pela amizade apoio e convívio agradável.

Ao Médico Veterinário Cléber Clos Cezarini e a sua equipe de inspeção pela ajuda, convívio, ensinamentos e amizade, durante as coletas nos frigoríficos.

À equipe do Biotério Central da UFPel por todo o auxílio durante os experimentos.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Resumo

SEIXAS NETO, Amilton Clair Pinto. **Isolamento de leptospiros em bovinos abatidos em frigoríficos de Pelotas/RS**. 2012. 39f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A leptospirose é causada por uma variedade de sorovares leptospirais os quais são distribuídos amplamente no mundo. A leptospirose bovina possui importância econômica nos países envolvidos na produção leiteira e de carne, devido as perdas na produção de leite e no peso dos animais acometidos. Além disso, infecções inaparentes em rebanhos representam um problema sério para o reconhecimento e disseminação da enfermidade. A leptospirose bovina não é somente um problema econômico, mas também um fator de risco para veterinários, trabalhadores rurais e magarefes. Vacinas disponíveis para a leptospirose bovina são preparações de células inteiras inativadas que protegem contra os sorovares presentes, tornando as vacinas importadas insatisfatórias para o controle da enfermidade em rebanhos brasileiros. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi isolar leptospiros de bovinos abatidos em frigoríficos de Pelotas, Brasil. Rins bovinos foram obtidos de 250 animais de três frigoríficos de Pelotas. Cada rim foi transportado ao laboratório em tubos individuais e processados para o isolamento até duas horas após o abate. Culturas foram incubadas a 30°C e examinadas semanalmente através de microscopia de campo escuro para a detecção da presença de leptospiros. Para determinar se os isolados eram virulentos para animais de laboratório, grupos de dois hamsters com 28 dias de idade foram inoculados através da via intraperitoneal com 10⁸ leptospiros de cada uma dos isolados. Para a caracterização definitiva dos novos isolados, culturas bacterianas e DNA foram enviados para a Fundação Oswaldo Cruz para a realização de sorogrupagem e sequenciamento de DNA. Três (1,2%) cepas foram isoladas dos rins de três bovinos machos adultos dos municípios do Capão do Leão (n=1) e Pedro Osório (n=2). Os novos isolados receberam o nome de BOV3, BOV14 e BOV15. O teste de virulência usando hamsters jovens mostrou que duas cepas (BOV3 e BOV15) foram capazes de reproduzir os principais achados clínicos e patológicos da leptospirose experimental. Nenhum animal infectado com BOV14 demonstrou sinais clínicos da enfermidade. Assim, este estudo relata o isolamento e a caracterização preliminar da virulência de três cepas de *Leptospira* de bovinos. Estes resultados demonstram o risco para a leptospirose em fazendas, abatedouros no sul do Brasil, para a transmissão a outras espécies animais e humanos. Técnicas adicionais estão sendo empregadas para a classificação definitiva dos novos isolados.

Palavras-chave: Leptospirose. Abatedouros. Diagnóstico. Risco Ocupacional. VNTR

Abstract

SEIXAS NETO, Amilton Clair Pinto. **Isolamento de leptospiros em bovinos abatidos em frigoríficos de Pelotas/RS**. 2012. 39f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Leptospirosis is caused by a variety of leptospiral serovars which are distributed worldwide. Bovine leptospirosis has economic importance to countries involved on dairy and beef raising, due the losses in milk yield of affected cows and in weight among beef cattle. In addition, inapparent infection in herds presents a serious problem in the recognition and spread of infection. Bovine leptospirosis is not only a financial hazard in endemic herds, but also an occupational risk factor for veterinarians, rural workers, and slaughterhouse employees. Furthermore, available vaccines for bovine leptospirosis are killed whole-cell preparations that protect against the serovars present, making imported vaccines unsatisfactory for the control of the disease in Brazilian herds. In this light, the present study's objective was to obtain new isolates of leptospires from cattle slaughtered in abattoirs of the city of Pelotas, Brazil. Bovine kidneys were obtained from 250 animals at three abattoirs of the city of Pelotas. Each kidney was transported to the laboratory in individual tubes and processed for isolation within two hours after slaughter. Cultures were incubated at 30°C and examined weekly for ten weeks by darkfield microscopy to detect the presence of leptospires. In order to determine if the isolates would produce infection in laboratory animals, groups of two 28-day-old hamsters were inoculated intraperitoneally with 10⁸ leptospires of each isolate. To definitely characterize the new isolates, bacterial culture and DNA were sent to Fundação Oswaldo Cruz for serogrouping and DNA sequencing. A total of three (1.2%) strains were isolated from the kidney tissue of adult male bovines from the Capão do Leão (n=1) and Pedro Osório (n=2) municipalities. The new strains were named BOV3, BOV14, and BOV15. The virulence test using young hamsters showed that the two strains (BOV3 and BOV15) were capable of reproducing the main clinical and pathological findings of experimental leptospirosis in hamsters. None of the animals demonstrated clinical signs of infection when infected with BOV14. This study reports the isolation of three strains of *Leptospira* from cattle and their preliminary virulence characterization. These results are demonstrating the risk of leptospirosis in farms and slaughterhouses in Southern Brazil, transmission to other livestock species, and exposure to humans. Additional tests are being employed for the classification of new isolates.

Keywords: Leptospirosis. Slaughterhouse. Diagnosis. Occupational Risk. VNTR

Lista de Figuras

- Figura 1 Análise macroscópica representativa, da necropsia realizada com hamsters inoculados no teste de virulência. (A) Hamster inoculado com a cepa BOV3; (B) Hamster inoculado com a cepa BOV14; (C) Hamster inoculado com a cepa BOV15. As setas brancas indicam presença de hemorragia pulmonar petequiral em (A) e (C) 25
- Figura 2 Amplificação do gene LipL32 nas cepas BOV3, BOV14, BOV15 e Fiocruz L1-130, onde 1=marcador de peso molecular 1 kb Plus (Invitrogen); 2=L1-130; 3=BOV3; 4=BOV14; 5=BOV15 26
- Figura 3 Amplificação do gene LigANI nas cepas BOV3, BOV14, BOV15 e Fiocruz L1-130. Onde 1=marcador de peso molecular 1 kb Plus (Invitrogen); 2,3=L1-130; 4=BOV3; 5=BOV14; 6=BOV15 26

Lista de Tabelas

Tabela 1	Principais estudos brasileiros sobre a prevalência de anticorpos anti- <i>Leptospira</i> em rebanhos bovinos, segundo o Estado, o ano e o tamanho da amostra.....	14
Tabela 2	Hospedeiros comumente associados à sorovares leptospirais.....	16
Tabela 3	Sumário dos resultados da VNTR, com os <i>locus</i> utilizados para a caracterização de <i>L. interrogans</i> e <i>L. borgpetersenii</i>	27

Lista de Abreviaturas

B1	Tiamina
B12	Cianocobalamina
BLAST	“ <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> ”
BSA	Albumina Sérica Bovina
CDTec	Centro de Desenvolvimento Tecnológico
CPqGM	Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz BA
DL50	Dose letal 50%
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EMJH	Ellinghausen–McCullough modificado por Johnson–Harris
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
ILS	Sociedade Internacional de Leptospirose
IP	Intraperitonal
LipL32	Lipoproteína de <i>Leptospira</i> de 32 kDa
LigA	<i>Leptospiral immunoglobulin-like A</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MAT	Teste de soroaglutinação microscópica
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
PFGE	Eletroforese em campo pulsado
pH	Potencial de Hidrogênio
rRNA	RNA ribossomal
g	Força da gravidade
rpoB	RNA polimerase subunidade B
VNTR	<i>Variable Number of Tandem Repeats</i>
µg	Micrograma(s)
µL	Microlitro(s)

Sumário

1 Introdução	12
2 Objetivos	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos Específicos	18
3 Material e Métodos	19
3.1 Amostras	19
3.2 Meio de cultura e condições de cultivo	19
3.3 Processamento das amostras	20
3.4 Teste de Virulência	20
3.5 Extração de DNA genômico	21
3.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	21
3.7 <i>Variable-Number Tandem-Repeat</i> (VNTR)	22
3.8 Aspectos Éticos	22
4 Resultados	24
4.1 Isolamento e Teste de virulência	24
4.2 Extração de DNA e PCR	25
4.3 VNTR	27
5 Discussão	28
6 Conclusões	32
Referências	33

1 Introdução

A leptospirose é uma zoonose de distribuição global (BARTHI et al., 2003). A doença é causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira*, as quais são disseminadas no ambiente através da urina contaminada de animais infectados (MONAHAN; CALLANAN; NALLY, 2009). A ampla variedade de manifestações clínicas e a ausência de um teste rápido para o diagnóstico laboratorial da doença aguda contribuem para que a leptospirose seja reconhecida como uma enfermidade negligenciada (HARTSKEERL; COLLARES-PEREIRA; ELLIS, 2011).

Leptospiras são bactérias aeróbicas obrigatórias com crescimento ótimo entre 28 e 30°C. O nome *Leptospira* é derivado da composição da palavra Grega *Leptos*, que significa fina e da palavra *spira* em Latin, que significa espiral, o que descreve perfeitamente a morfologia da espécie (DELLAGOSTIN et al., 2011). *In vitro*, as leptospiras possuem um crescimento relativamente lento, as quais requerem um meio de cultura suplementado com ácidos graxos de cadeia longa, os quais são a principal fonte de carbonos e energia, vitaminas B1 e B12, e sais de amônio (EVANGELISTA; COBURN, 2010). O meio de cultura artificial mais difundido e utilizado amplamente é o meio comercial Ellinghausen–McCullough modificado por Johnson–Harris (EMJH), o qual pode ser suplementado com ácido oléico, albumina sérica bovina (BSA), polisorbato (*Tween*) e soro descomplementado de animais (FAINE et al., 1999).

Desde as últimas décadas, a leptospirose humana vem sendo considerada uma enfermidade emergente, re-emergente ou re-descoberta, devido aos numerosos surtos que ocorreram em vários países no mundo (LEVETT, 1999; (HARTSKEERL; COLLARES-PEREIRA; ELLIS, 2011). Atualmente, a leptospirose alcança o elevado número de 500.000 casos por ano em nível mundial, com uma letalidade de 10% nos casos graves (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009). No Brasil, mais de 12.000 casos da leptospirose humana são notificados anualmente,

principalmente durante as epidemias nas grandes cidades do país, acarretando um custo consideravelmente elevado para o sistema de saúde com as internações e os tratamentos (GOUVEIA et al., 2008).

A leptospirose animal no Brasil não é uma doença de notificação compulsória. Por esse motivo, a enfermidade não é submetida a um controle organizado por órgãos e entidades públicas ou privadas de sanidade animal, dificultando o verdadeiro conhecimento da extensão das infecções por *Leptospira* em qualquer região do país (ARAÚJO et al., 2005). Assim, dados oficiais referentes à ocorrência da leptospirose em bovinos no Brasil ainda são pouco disponíveis.

A leptospirose bovina resulta em graves prejuízos para os produtores rurais, e conseqüentemente, para a economia dos países acometidos. A doença que normalmente manifesta-se na forma crônica assintomática, apresenta elevados índices de abortos e animais natimortos, infertilidade de machos e fêmeas, e a redução na produção de leite (ELLIS, 1994). Além do importante impacto econômico, a doença nos bovinos é considerada como um fator de risco ocupacional para veterinários (KINGSCOTE, 1995, 1986; PRESCOTT et al., 1992; LEVETT, 2001), magarefes (PRESCOTT et al., 1992; TERRY; TRENT; BARTLETT, 2000; GONÇALVES et al., 2006; DORJEE et al., 2011) e produtores rurais (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

No final da década de 50, surgiram os primeiros trabalhos sobre a leptospirose bovina no Brasil, com a identificação da infecção pelo sorovar Pomona em um feto bovino (FREITAS, 1957). Este fato despertou grande interesse por parte de pesquisadores brasileiros, e a pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira* em rebanhos bovinos e o isolamento do agente passaram a ser realizados com maior interesse no Brasil (LILENBAUM, 1996). Embora os inúmeros trabalhos disponíveis publicados apresentem delineamentos experimentais, taxas de prevalência e incidência, períodos de execução e amostragem variáveis, todos convergem para que a leptospirose bovina no Brasil seja considerada uma enfermidade endêmica (tab.1).

As prevalências da leptospirose em bovinos, que estão citadas na tab.1, foram obtidas pela utilização do teste de soroaglutinação microscópica (MAT), o qual é o teste padrão-ouro para o diagnóstico sorológico da leptospirose (WHO, 2003). Apesar de apresentar uma elevada sensibilidade e especificidade, o MAT é dependente do painel de antígenos empregado e dos critérios adotados para a interpretação dos exames (ADLER; de la PEÑA MOCTEZUMA, 2010). Além disso,

para a obtenção do máximo de confiabilidade e padronização do MAT, os laboratórios credenciados para sua execução são encorajados a solicitar periodicamente um painel de cepas aos laboratórios de referência nacionais e realizarem o teste internacional de proficiência, que é o controle de qualidade internacional do teste, o qual é organizado pela Sociedade Internacional de Leptospirose (ILS) (CHAPPEL et al., 2004; HARTSKEERL, 2005).

Tabela 1 – Principais estudos brasileiros sobre a prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* em rebanhos bovinos, segundo o Estado, o ano e o tamanho da amostra

Estado Brasileiro	Ano de execução	Amostra (n)	Prevalência (%)	Referência
RJ	1995	405	68,4	LILENBAUM; SANTOS, 1995
	2003	379	46,9	LILENBAUM; SOUZA, 2003
SP	1974 a 1980	644	27,2	GIORGI et al., 1981
	1996 a 1997	2.761	45,6	LANGONI et al., 2000
	1999	951	78,8	MELO, 1999
MG	1979	2.702	27,8	MOREIRA et al., 1979
	1980 a 2002	39.012	32,4	ARAÚJO et al., 2005
RS	1977	184	42,6	OLIVEIRA, 1977
	1985	1.000	49,8	ABUCHAIM et al., 1985
	1995	3.265	41,5	BROD et al., 1994
PR	1995 a 1997	1.253	13,3	RODRIGUES et al., 2007
BA	1997 a 1999	109	89,0	VIEGAS et al., 2001
	1990 a 1993	1.410	83,8	CALDAS, 1993
PI	2000 a 2001	1.975	52,9	MINEIRO et al., 2007
MT	1980	670	74,5	MADRUGA et al., 1980
MS	1999	321	78,2	RIBEIRO et al., 1999
GO	2006	140	74,2	CAMPOS JR et al., 2006
AM	2001	2.109	52,8	AGUIAR et al., 2006
(*)	1960 a 1968	15.080	23,6	SANTA ROSA et al., 1969
(*)	1997	2.761	61,0	VASCONCELLOS et al., 1997
(**)	1984 a 1997	31.325	52,8 a 0,1	FAVERO et al., 2001

Legenda: (*) 6 Estados brasileiros; (**) 21 Estados brasileiros.

Fonte: Compilado de vários autores.

Até a década de 70 no Brasil, a maioria dos estudos sorológicos realizados utilizaram painéis que não continham o sorovar Hardjo, e em virtude disso, os sorovares Pomona, Wolffi e Serjoe eram os mais prevalentes (LILENBAUM, 1996). A partir da década de 80, com a inclusão do sorovar Hardjo nas baterias brasileiras para o MAT, novos trabalhos foram realizados para melhor compreensão

epidemiológica deste sorovar nos rebanhos bovinos brasileiros. Assim, o sorovar Hardjo passou a ser detectado como o mais prevalente em bovinos não somente na América do Norte, na Europa e na Oceania, mas também na América do Sul e no Brasil (LILENBAUM, 1996; BOLIN, 1999).

Em 1993, em Minas Gerais, ocorreu o primeiro e único isolamento descrito até hoje do sorovar Hardjo no Brasil (MOREIRA, 1994). Desde então, a cepa Norma vem sendo utilizada em estudos sorológicos no Brasil, detectando um maior número de animais positivos em comparação com a cepa padrão. As diferenças entre as cepas Norma e Hardjoprajtino (cepa de referência) foram observadas com maior ou menor intensidade em populações de bovinos e ovinos em outros Estados do Brasil (MOREIRA, 1994; HERMANN et al., 2004; ARAÚJO et al., 2005; LAGE et al., 2007). Sendo assim, o isolamento e a utilização de cepas locais no MAT são imprescindíveis para o aumento da sensibilidade e da especificidade do teste, já que a maioria das cepas que compõem o painel da OMS são oriundas de países com clima e fauna muito distintas do Brasil (WHO, 2003).

A transmissão da leptospirose requer uma circulação contínua do patógeno entre os hospedeiros reservatórios ou também denominados de hospedeiros de manutenção, os quais alguns sorovares leptospirais demonstram específica, mas não inteiramente exclusiva preferência (tab.2). Dessa forma, os bovinos são considerados hospedeiros de manutenção dos sorovares Hardjo e Pomona (BHARTI et al., 2003). Entretanto, eles podem ser infectados também com uma ampla variedade de sorovares, os quais são comumente identificados nas outras espécies animais do ecossistema local onde vivem, onde neste caso, os bovinos são considerados como hospedeiros acidentais (FAINE et al., 1999; KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009). Nas infecções em que os bovinos são hospedeiros de manutenção, elas são caracterizadas por uma alta incidência de infecções subclínicas com a ocorrência de infertilidade e falhas reprodutivas. Por outro lado, nas infecções acidentais, principalmente com os sorovares Grippotyphosa e Icterohaemorrhagiae, ocorre uma maior frequência da doença aguda e severa (FAINE et al., 1999).

Até o final da década de 80, os isolados de *Leptospira* eram classificados apenas através de provas sorológicas, sendo distribuídos em sorogrupos e sorovares (FAINE et al., 1999). Mais recentemente, a classificação molecular vem sendo amplamente utilizada, dividindo o gênero *Leptospira* em espécies genômicas

com base na homologia do DNA (YASUDA et al., 1987; BRENER et al., 1999; ADLER; de la PEÑA MOCTEZUMA, 2010). Assim, a classificação das leptospiros utilizando determinantes genéticos e moleculares vem fornecendo importantes informações taxonômicas, mas a designação das leptospiros em sorovares e sorogrupos ainda permanece sendo útil e familiar para os clínicos e os epidemiologistas (BHARTI et al., 2003). Com isso, o cenário atual é a descrição de 14 espécies genômicas patogênicas e seis saprófitas, as quais possuem 260 e 60 sorovares, respectivamente (LEVETT, 2001; DELLAGOSTIN et al., 2011).

Tabela 2 – Hospedeiros comumente associados à sorovares leptospirais

Hospedeiros	Sorovares
Bovinos	Hardjo, Pomona
Camundongos	Ballum, Arborea, Bim
Caninos	Canicola
Equinos	Bratislava
Marsupiais	Grippothyphosa
Morcegos	Cynopteri, Wolffi
Ovinos	Hardjo
Ratos	Icterohaemorrhagiae, Copenhageni
Suínos	Pomona, Tarassovi

Fonte: BARTHI et al., 2003.

A classificação sorológica de novos isolados através da sorogrupagem possui uma metodologia muito trabalhosa para sua execução. Embora seja amplamente difundida, a técnica requer a manutenção de um número elevado de cepas vivas e anti-soros (FAINE et al., 1999). Outra técnica utilizada para a tipificação de cepas é o emprego de painéis de anticorpos monoclonais (TERPSTRA, 1992). Apesar de ser uma técnica com custo elevado para a sua implementação e de ser executada apenas no laboratório de referência *Royal Tropical Institute* na Holanda, o seu uso pode ser justificado pois os hibridomas estáveis produzem por tempo indeterminado o anticorpo monoclonal desejado (KOHLENER e MILSTEIN, 1975), evitando assim o uso de um número elevado de animais como é o caso da produção de anticorpos policlonais.

Nos últimos anos, algumas técnicas moleculares estão sendo desenvolvidas e empregadas na tipificação de isolados de leptospiros. *Variable Number of Tandem Repeats* (VNTR) (MAJED et al., 2005), o seqüenciamento de DNA (CERQUEIRA et

al., 2010) e a eletroforese em campo pulsado (PFGE) (GALOWAY; LEVETT, 2008) demonstram ser promissoras para a caracterização molecular de isolados. Porém, com raras exceções, essas técnicas são realizadas apenas em laboratórios com equipamentos e estrutura pertencentes aos grandes centros de pesquisa no país.

Neste contexto, o isolamento de cepas do ecossistema local e a sua inclusão nos painéis de antígenos empregados no MAT, bem como a sua utilização para o desenvolvimento de vacinas autóctones, é de fundamental importância para o diagnóstico, epidemiologia e controle da enfermidade em nossa região e no Brasil. Além disso, o isolamento de cepas de bovinos em abatedouros demonstra o risco para a transmissão da leptospirose nas fazendas, nos abatedouros localizados no sul do Brasil e para animais e humanos suscetíveis.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Isolar leptospiros de bovinos abatidos em frigoríficos de Pelotas/RS.

2.2 Objetivos específicos

Cultivar rins de bovinos, coletados durante o abate em frigoríficos de Pelotas/RS, visando o isolamento de leptospiros patogênicos;

Testar a virulência das cepas isoladas em hamster (*Mesocricetus auratus*), um modelo animal suscetível a leptospirose, avaliando as manifestações clínicas e os achados patológicos dos animais;

Realizar uma caracterização preliminar dos isolados, utilizando PCR e VNTR.

3 Material e Métodos

3.1 Amostras

Para a execução do projeto, três frigoríficos da cidade de Pelotas foram escolhidos para a execução do presente estudo. Os critérios para a escolha dos estabelecimentos foram baseados na localização, na rotina de abate e pela disponibilidade do serviço de inspeção durante as coletas. Os três estabelecimentos possuem o nível de inspeção Estadual e realizam o abate de bovinos e ovinos oriundos de municípios da região Sul do Rio Grande do Sul, como Pelotas, Capão do Leão, Pedro Osório, Rio Grande, Canguçu, Turuçu e Morro Redondo. Para a tentativa de isolamento, rins foram coletados aleatoriamente na linha de abate, após a inspeção realizada pelo médico veterinário responsável. Após a limpeza e inspeção do órgão foi realizada a remoção de um fragmento de um dos lóbulos do rim, com aproximadamente 9cm³, o qual foi colocado em um recipiente plástico estéril, identificado e acondicionado em uma caixa térmica apropriada para o transporte.

3.2 Meio de cultura e condições de cultivo

O meio de cultura utilizado no estudo foi o meio EMJH (*Difco Laboratories, Detroit, Estados Unidos*), o qual é amplamente utilizado para o cultivo *in vitro* de leptospiros (FAINE et al., 1999). Para a confecção dos meios de cultura, o meio base foi preparado dentro de frascos de vidro previamente esterilizados, ajustando-se o pH em 7,4. Após a mistura completa, o frasco foi esterilizado em autoclave a 121°C, durante 15 minutos. No procedimento de esterilização, o meio de cultura foi colocado em banho de água para ajustar a temperatura em 40°C, quando foram adicionados os suplementos e o Ágar (meio semi-sólido). Para a confecção de um

meio seletivo e específico para leptospiras, foram adicionados em capela de fluxo laminar dois suplementos, o comercial (*Difco Laboratories, Detroit, USA*) e o soro de coelho fornecido pelo Biotério Central da UFPel, ambos na proporção de 10% do volume total. Para o estoque, o meio de cultura foi distribuído em tubos plásticos para centrífuga de 50mL, os quais foram lacrados e identificados, e armazenados em refrigeração. Para o uso, foi distribuída a quantidade de 5mL em tubos para centrífuga de 15mL, onde o meio de cultura foi submetido a prova de esterilidade durante 24 horas, a 30°C. Antes da utilização do meio de cultura para o isolamento foram repicadas algumas cepas do uso de rotina do laboratório para a verificação da sua viabilidade.

3.3 Processamento das amostras

Ao final de cada procedimento de coleta, o material foi transportado imediatamente ao laboratório de Vacinologia do Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec) onde foi processado. Dentro de uma cabine de fluxo laminar, previamente esterilizada, as amostras foram manipuladas com instrumentais cirúrgicos estéreis (bisturi, tesouras e pinças), para a execução da técnica de semeadura em meio de cultura. Para isso, fragmentos de 2-3cm³ do tecido renal coletado foram removidos assepticamente e colocados dentro de uma seringa de 5mL estéril, onde com uma cuidadosa pressão, realizou-se o macerado do tecido diretamente dentro do tubo com 5mL com meio de cultura EMJH líquido. Após, o tubo foi homogeneizado gentilmente e deixado por até 1 hora em repouso no escuro para a formação do sedimento. Decorrido esse período, foi realizado um repique de 0,5mL do líquido próximo da superfície para um tubo com 5mL de meio de cultura semi-sólido. Após o processamento semelhante de todas as amostras, os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 29°C e verificados semanalmente, macro e microscopicamente, durante até doze semanas.

3.4 Teste de virulência

Para o teste de virulência, utilizou-se o protocolo de Silva et al. (2008). Grupos de dois hamsters machos, com 4 semanas de idade foram inoculados com 1mL (10^8 leptos/mL⁻¹) de cada uma das cepas, através da via intraperitoneal (IP).

Após a infecção, todos os animais foram mantidos em microisoladores, sendo alojados em estantes ventiladas com temperatura controlada. Todos os animais foram monitorados diariamente, observando-se o aparecimento dos sinais clínicos e óbitos. Durante o experimento, os animais moribundos foram eutanasiados, realizando-se a análise macroscópica dos órgãos e tecidos. Procedeu-se também, a coleta de um rim de cada hamster para a tentativa de reisolamento das cepas.

3.5 Extração de DNA genômico

Para a extração de DNA, as cepas foram cultivadas a 29°C, em meio EMJH líquido suplementado com 10% de suplemento comercial. Após 7 dias, quando a cultura apresentou uma densidade de 1 a 2×10^8 .mL⁻¹, procedeu-se a centrifugação a 3.000 x g durante 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o pellet foi armazenado até o uso em -20°C. O DNA genômico foi extraído segundo o protocolo de extração de DNA genômico de bactérias gram-negativas do “*GFX Genomic Blood DNA purification Kit*” (Amersham - GE Healthcare). O DNA extraído foi submetido a eletroforese em gel de agarose 0,8% a fim de avaliar a sua qualidade. O DNA extraído foi mantido a -20°C até o uso.

3.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Durante a execução do projeto, todas as culturas positivas foram avaliadas pela PCR. Utilizando o procedimento de extração de DNA genômico, a PCR foi realizada para amplificar o gene da lipoproteína LipL32, o qual está presente apenas em leptospiros patogênicos (HAAKE et al. 2000). Os oligonucleotídeos (*primers*) *lipL32F* 5'CGCTTGTGGTGCTTTCGGTGGT3' e *lipL32R* 5'CTCACCGATTTGCCTGTTGGG3' (AHMED et al., 2006), foram desenhados com a finalidade de amplificar um fragmento de 474pb. Outro gene a ser amplificado foi LigA (*Leptospiral Immunoglobulin-Like A*) a qual está presente apenas em leptospiros patogênicos e nas espécies *L. interrogans* e *L. kirschneri* (McBRIDE et al., 2009), *primers* foram desenhados com a finalidade de amplificar um fragmento de 1802pb. Todos os *primers* foram construídos e analisados mediante o uso do software *Vector NTI 8.0* (Invitrogen).

As reações de PCR com a finalidade de amplificar os genes foram realizadas em termociclador *Mastercycler gradient* (Eppendorf) utilizando a seguinte programação: uma etapa de desnaturação inicial de 94°C por 10 minutos, seguido de 35 ciclos que incluem 94°C por 30 segundos, 54°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto. Uma etapa final de 72°C por 7 minutos foi incluída. Os componentes que fazem parte desta reação são: 2,5µL de 10X tampão da enzima; 0,75µL de 50mM de MgCl₂; 0,5µL de 10mM dNTPs; 2,0µL de 10 pmol.µL⁻¹ conjunto de *primers*, 50ng de DNA genômico e 0,25µL (2,5 unidades) da enzima Taq DNA polimerase (CERQUEIRA, 2006). A purificação do produto de PCR foi feita com o *GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare), segundo instruções do fabricante, submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% e armazenados a -20°C.

3.7 Variable-Number Tandem-Repeat (VNTR)

Os *loci* VNTR e as técnicas utilizadas neste trabalho foram previamente descritos por Majed et al. (2005) para *L. interrogans* e por Salaun et al. (2006) para *L. borgpetersenii*. A amplificação dos *loci* VNTR foi realizada através de PCR utilizando a enzima *Taq DNA polimerase* (Invitrogen) em um termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf), sob as seguintes condições: 1 ciclo de desnaturação à 94°C por 5min; 35 ciclos de desnaturação à 94°C por 30s, anelamento à 55°C por 30s e extensão à 72°C por 1min, e um ciclo final de extensão à 72°C por 10min. Após, a purificação do produto de PCR foi feita com o *GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare), segundo instruções do fabricante. O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2%. Para a análise, o número de cópias de cada *locus* VNTR foi calculado conforme Majed et al. (2005) e Salaun et al. (2006).

3.8 Aspectos éticos

Esta dissertação faz parte de um projeto cadastrado no COCEPE/UFPel sob o número 5.00.00.019 e analisado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPel, processo nº 23110.004657/2010-84. Os animais utilizados neste trabalho foram tratados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação

Animal (COBEA). Além disso, o laboratório de Biologia Molecular (CDTec) possui Certificado de Qualidade em Biossegurança nº0081/98.

4 Resultados

4.1 Isolamento e Teste de Virulência

Duzentos e cinquenta amostras foram coletadas durante o período de execução do projeto. Destas, 23 (9,2%) contaminaram com outros microrganismos, 224 (89,6%) foram descartadas como culturas negativas ao final de doze semanas, e três (1,2%) amostras resultaram em culturas positivas. As cepas foram denominadas de BOV3, BOV14 e BOV15. De acordo com as informações obtidas nos frigoríficos onde as cepas foram isoladas, os animais eram machos adultos, procedentes dos municípios do Capão do leão (BOV3) e Pedro Osório (BOV14 e BOV15).

Embora uma das cepas (BOV3) tenha sido isolada 14 dias antes das demais, todas as cepas isoladas passaram pelo mesmo protocolo de procedimentos, sendo repicadas para os meios EMJH líquido e semi-sólido para manutenção e expansão, respectivamente, a partir da sua detecção em microscopia de campo escuro, teste de virulência, para o crescimento em maior escala para a extração de DNA genômico, congelamento em -70°C e nitrogênio líquido, e para o encaminhamento para a realização do ensaio de sorogrupagem.

Após a sincronia entre o crescimento das cepas com o fornecimento dos animais pelo Biotério Central da UFPel, as cepas foram submetidas ao teste de virulência. O resultado do teste de virulência revelou que duas cepas (BOV3 e BOV15) foram capazes de reproduzir os principais achados clínicos da leptospirose experimental. Os sinais clínicos encontrados nestes dois grupos de animais iniciaram a partir do 5º dia, manifestando prostração, isolamento na caixa, desidratação, perda de peso e o óbito em 100% dos animais inoculados entre o 7º e 8º dia. Por outro lado, a cepa BOV14 não foi capaz de causar a enfermidade clínica

e nem o óbito dos animais de seu grupo, mesmo quando o procedimento foi repetido posteriormente.

Todos os animais que morreram durante o teste, pertencentes aos grupos inoculados com as cepas BOV3 e BOV15, evidenciaram alterações macroscópicas descritas como típicas da leptospirose experimental, como a icterícia nas mucosas, a congestão de órgãos e hemorragias petequiais pulmonares, quando submetidos a necropsia. Já os animais sobreviventes (cepa BOV14), após a eutanásia no dia 15, não exibiam alterações macroscópicas (fig.1). Contudo, o reisolamento das três cepas foi obtido com sucesso a partir do cultivo do tecido renal de todos os 6 animais submetidos ao teste de virulência.



Figura 1 - Análise macroscópica representativa, da necropsia realizada com hamsters inoculados no teste de virulência. (A) Hamster inoculado com a cepa BOV3; (B) Hamster inoculado com a cepa BOV14; (C) Hamster inoculado com a cepa BOV15. As setas brancas indicam presença de hemorragia pulmonar petequial em (A) e (C).

4.2 Extração de DNA e PCR

A extração de DNA genômico das três cepas foi realizada com sucesso e o DNA foi armazenado a -20°C até o uso. A PCR para a amplificação de *lipL32* revelou o fragmento esperado de 474pb para todas as cepas isoladas (fig.2), e a amplificação do gene que codifica para LigANI, revelou que BOV3 e BOV15 apresentaram bandas de aproximadamente 2000pb, enquanto que a cepa BOV14 não amplificou o gene LigANI (fig.3). A cepa FIOCRUZ L1-130, utilizada como controle, também amplificou uma banda de aproximadamente 2000pb. Assim, estes resultados confirmaram que as três cepas são patogênicas.

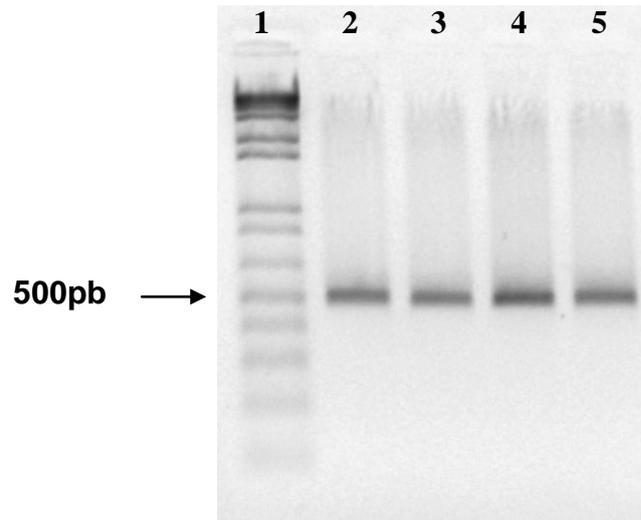


Figura 2 – Amplificação do gene LipL32 nas cepas BOV3, BOV14, BOV15 e Fiocruz L1-130, onde 1=marcador de peso molecular 1 kb Plus (Invitrogen); 2=L1-130; 3=BOV3; 4=BOV14; 5=BOV15

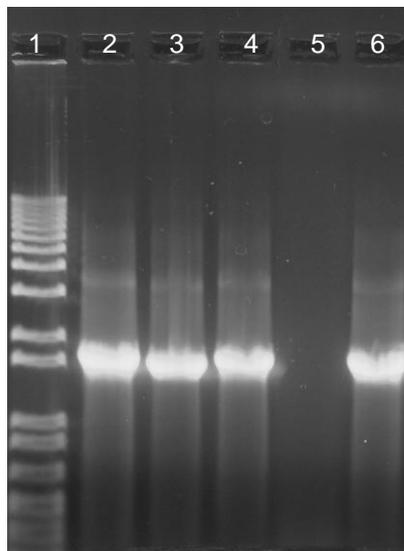


Figura 3 – Amplificação do gene LigANI nas cepas BOV3, BOV14, BOV15 e Fiocruz L1-130. Onde 1=marcador de peso molecular 1 kb Plus (Invitrogen); 2,3=L1-130; 4=BOV3; 5=BOV14; 6=BOV15

4.3 VNTR

O resultado da VNTR pode ser observado na tab.3. De acordo com os resultados disponíveis da coleção de isolados analisados pelo método de VNTR, descritos por Majed et al. (2005) para *L. interrogans* e por Salaun et al. (2006) para *L. borgpetersenii*, as cepas BOV3, BOV14 e BOV15 foram classificadas até o nível de espécie, não sendo possível a caracterização em nível de sorovar. Assim, as três cepas foram identificadas como pertencentes à espécie *L. borgpetersenii*, devido a amplificação do produto de PCR do marcador Lb4 e a não amplificação do produto de PCR do marcador 7bis.

Tabela 3 – Sumário dos resultados da VNTR, com os *locus* utilizados para a caracterização de *L. interrogans* e *L. borgpetersenii*

Isolado	Locus												
	<i>L. interrogans</i>								<i>L. borgpetersenii</i>				
	4	7	9	10	11	19	23	31	Lb4	Lb5	4bis	7bis	10bis
BOV3	2	15	4	8	16	6	16	-	9	10	2	-	7
BOV14	3	18	7	11	20	6	-	-	5	10	7	-	8
BOV15	3	18	7	11	20	6	-	-	5	8	7	-	8

Fonte: este estudo.

5 Discussão

Com o passar das décadas, o estudo da leptospirose bovina ganhou um grande destaque, não apenas pelo interesse econômico da atividade, mas também porque o bovino foi apontado como um importante reservatório da leptospirose humana (BOLIN, 1999; ADLER; de la PEÑA MOCTEZUMA, 2010). Além disso, a leptospirose bovina é uma doença ocupacional, onde as profissões como as de magarefe, fazendeiro e veterinário são consideradas de alto risco (LEVETT, 2001; BHARTI et al., 2003; DORJEE et al., 2011).

No Brasil, a leptospirose bovina apesar de ser subdiagnosticada, é considerada uma doença endêmica nas diferentes regiões do país. Este fato pode ser atribuído principalmente aos animais que apresentam uma manifestação clínica crônica ou assintomática, tornando-se assim portadores da doença, os quais podem eliminar a bactéria por um longo período no ambiente, disseminando a enfermidade para bovinos e outras espécies (LEVETT, 2001; ADLER; de la PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

A vacinação contra a leptospirose bovina no Brasil e no mundo apresenta sérias limitações. As preparações vacinais disponíveis são bacterinas, as quais são sorovar-específica, ou seja, a proteção é conferida apenas para os sorovares que constituem a vacina (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009). Outro fato interessante ocorre com o sorovar Hardjo, o qual possui cepas classificadas ou na espécie *L. interrogans* e *L. borgpetersenii*, e é amplamente utilizado na constituição de vacinas bovinas. Vacinas com *L. interrogans* sorovar hardjo induzem a uma resposta humoral, enquanto que *L. borgpetersenii* sorovar hardjo induz a uma resposta celular (NAIMAN et al., 2002). Além disso, essas vacinas disponíveis comercialmente são constituídas por cepas isoladas em outros países do mundo, com fauna e ecossistemas diferentes das existentes em nosso país (LILENBAUM, 1996).

Neste trabalho relatamos o isolamento de 3 cepas de *Leptospira* do tecido renal de bovinos em frigoríficos da região de Pelotas. Este resultado é inédito para o nosso grupo de pesquisas, já que anteriormente havíamos isolado cepas de humanos, caninos, camundongos e ovinos (SILVA et al., 2007, 2008, 2009, 2010). Embora a procedência dos animais fosse de municípios próximos de Pelotas, os isolamentos demonstram que o ecossistema da região sul do Rio Grande do Sul é rico em diversidade de microrganismos, o que já havia sido evidenciado nos trabalhos anteriores com o isolamento de sorogrupos como Autumnalis, Australis, Ballum, Bataviae, Canicola, Djasiman e Icterohaemorrhagiae (SILVA et al., 2007, 2008, 2009, 2010).

A inoculação de leptospiros em hamsters permanece sendo uma ferramenta essencial em muitos aspectos para o estudo da leptospirose (HAAKE, 2006). Neste trabalho, o teste de virulência permitiu selecionar duas cepas que causam a leptospirose experimental em hamster, com manifestações clínicas e patológicas semelhantes as que são descritas em humanos e animais doentes (BHARTI, et al., 2003). Com isso, os isolados BOV3 e BOV15 poderão ser empregados em ensaios para a determinação da dose letal 50% (DL50), e posteriormente, em experimentos que visam avaliar a imunoproteção conferida por vacinas produzidas em nosso grupo.

Embora a cepa BOV14 não tenha causado óbito nos animais inoculados, provocou uma infecção assintomática, sendo possível o reisolamento da cepa. Este fato também é descrito para sorovares como Hardjo, por exemplo, que mesmo sendo patogênicos, raramente causam doença aguda em hamsters (KINGSCOTE, 1980). Mesmo assim, o isolado BOV14 pode ser recuperado dos rins dos animais inoculados ao final de 15 dias, demonstrando que pode causar a colonização renal e doença assintomática, o que permitirá estudos relacionados com a patogênese da doença com evolução crônica em modelo experimental.

Em nosso estudo, o gene *lip32* foi amplificado nos três isolados, apresentando uma banda no gel de agarose de 474pb, conforme o esperado. Este gene codifica para uma lipoproteína de membrana externa intimamente associada com a adesão do patógeno a célula do hospedeiro e está presente somente nas espécies patogênicas de *Leptospira* (HAAKE et al., 2000). Dessa forma, a amplificação de *lipL32* confirma que as três cepas são leptospiros patogênicos.

O gene *ligA*, conforme descrito por McBride et al. (2009), está presente somente em algumas cepas das espécies patogênicas *L. interrogans* e *L. kirschneri*, e dessa forma, os *primers* utilizados neste estudo foram construídos baseados na sequência de *L. interrogans* Fiocruz L1-130 (SILVA et al., 2007). Em nosso estudo, foi possível observar a amplificação do gene *ligA* na cepa controle (Fiocruz L1-130) e nas cepas BOV3 e BOV15. Porém, a cepa BOV14 não amplificou o fragmento do gene *LigA*. Embora este resultado seja preliminar, outros experimentos serão realizados para a confirmação do polimorfismo de *ligA* nos isolados.

A análise do número variável de repetições em tandem (VNTR) é baseada na premissa de que o número de repetições de cada um dos 13 *loci* selecionados define a cepa de leptospiros patogênicos (MAJED et al, 2005; SALAUN et al, 2006). Utilizando o conjunto de *primers* específicos para identificação de cepas de *L. interrogans* (MAJED et al, 2005), não foi possível caracterizar nossos isolados comparando-os com o padrão de VNTR das principais cepas de referência. Já com o conjunto de *primers* para identificação de cepas de *L. interrogans*, *L. kirschneri* e *L. borgpetersenii*, também não foi possível identificar nossos isolados porque também não havia padrões semelhantes.

Por outro lado, também foi descrito que o *loci* Lb4 não gera *amplicons* em cepas das espécies *L. interrogans* e *L. kirschneri* e gera apenas *amplicons* para cepas de *L. borgpetersenii* (SALAUN et al, 2006). Os três isolados geraram *amplicons* com o *primer* Lb4, sugerindo dessa forma, que os isolados pertençam à espécie *L. borgpetersenii*. Além disso, também está descrito que o *loci* 7bis gera *amplicons* em cepas das espécies *L. interrogans* e *L. kirschneri* e não gera *amplicons* para cepas de *L. borgpetersenii*. Os três isolados não geraram *amplicons* com o *primer* 7bis, reforçando a informação dada pelo *loci* Lb4 que os três isolados pertençam à espécie *L. borgpetersenii*.

A função de elementos repetitivos em bactérias não é totalmente entendida. Os *loci* estão localizados em regiões intergênicas dispersas no genoma e que provavelmente, sejam elementos genéticos móveis (CERQUEIRA; PICARDEAU, 2009). Como consequência, a variabilidade do número de cópias de VNTR é alta, evidenciado pela grande diversidade de padrões de VNTR presente nas principais cepas de referência estudadas (MAJED et al, 2005; SALAUN et al, 2006). Provavelmente, os isolados não apresentaram padrões de VNTR semelhantes aos

descritos porque são sorovares exclusivos da nossa região e não estão incluídos nos painéis analisados até o momento.

Em nosso trabalho, de acordo com a soma dos resultados das técnicas genotípicas utilizadas de forma preliminar, foi possível caracterizar os isolados BOV3 e BOV15 como virulentos e patogênicos, devido ao resultado do teste de virulência e da amplificação de *lip32*, respectivamente. Além disso, nos isolados BOV3 e BOV15 também foi amplificado o gene de *ligA*, o qual foi descrito como exclusivo das espécies *L. interrogans* e *L. kirschneri* (McBRIDE et al., 2009). Já o isolado BOV14, embora não virulento para hamsters e não sendo possível a amplificação de *ligA*, foi classificado como patogênico devido a amplificação de *lip32*.

No trabalho de McBRIDE et al. (2009) foi descrito que em algumas das cepas analisadas de *L. borgpetersenii*, *L. santarosai* e *L. weilli* não foi possível determinar a ausência ou presença do gene *ligA*, não sendo definitiva assim, a afirmação de que o gene *ligA* está presente somente nas espécies *L. interrogans* e *L. kirschneri* (McBRIDE et al., 2009). Portanto, nossos resultados sugerem que o gene *LigA* pode estar presente também na espécie *L. borgpetersenii*, pois a análise de VNTR mostrou que todos os isolados pertencem a espécie *L. borgpetersenii*. Sendo assim, experimentos de sequenciamento dos genes 16S rRNA e *rpoB*, além de sorogrupagem, devem ser realizados para a caracterização definitiva das três cepas.

Neste trabalho, relatamos o isolamento de três cepas de bovinos em frigoríficos de Pelotas. Destas, duas cepas foram altamente virulentas para hamsters, um modelo experimental suscetível a leptospirose. Este fato torna-se ainda mais importante para a saúde pública, principalmente para os motoristas de caminhão, os funcionários de frigoríficos e os médicos veterinários, os quais são integrantes de profissões de risco ocupacional. Além disso, baseando-se no conhecimento de que cada sorovar possui uma especificidade de hospedeiro, a identificação definitiva dos três isolados implicará favoravelmente no desenvolvimento de vacinas autóctones, no diagnóstico, epidemiologia e controle da enfermidade em nossa região e no Brasil.

6 Conclusões

- Neste estudo, três cepas foram isoladas de 250 amostras de rins bovinos, coletados em três frigoríficos de Pelotas/RS;

- As cepas BOV3 e BOV15 reproduzem a leptospirose experimental em hamster, as quais causam o óbito, manifestações clínicas e patológicas nos animais semelhantes às descritas nas formas graves da leptospirose humana e animal. Assim, as cepas BOV3 e BOV15 são candidatas aos ensaios de DL50 e ao teste de vacinas que visem o controle da leptospirose bovina;

- A cepa BOV14 não é capaz de reproduzir a enfermidade letal em hamster. Entretanto, ela pode ser utilizada em estudos sobre a leptospirose crônica e sobre a colonização renal;

- Embora a técnica VNTR tenha classificado as cepas como pertencentes a espécie *L. borgpetersenii*, estudos complementares devem ser realizados para a caracterização molecular e sorológica definitiva dos três isolados.

Referências

ABUCHAIM, D.M.; DUTRA, N.L.F. Prevalência da leptospirose em bovinos da bacia leiteira de Porto Alegre, RS. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, v.13, p.55-60, 1985.

ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA A. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3, p. 287-296, 2010.

AGUIAR, D.M.; GENNARI, S.M.; CAVALCANTE, G.T.; LABRUNA, M.B.; VASCONCELLOS, S.A.; RODRIGUES, A.A.R.; MORAES, Z.M.; CAMARGO, L.M.A. Seroprevalence of *Leptospira* spp in cattle from Monte Negro municipality, western Amazon. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.26, n.2, p.102-104, 2006.

AHMED, N.; DEVI, S.M.; VALVERDE, M.D.E. L.; VIJAYACHARI, P.; MACHANG'U R.S.; ELLIS, W.A.; HARTSKEERL, R.A. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 23, p. 25-28, 2006.

ARAÚJO, V.E.M.; MOREIRA, E.C.; NAVEDA, 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. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.4, p.430-435, 2005.

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.; VINETZJ. M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infectious Disease**. v.3, p. 757-771, 2003

BOLIN, C.A. Clinical signs, diagnosis, and prevention of bovine leptospirosis. **The Bovine Practitioner**, v.33, n.1, p.50-55, 1999.

BRENNER, D.J.; KAUFMANN, A.F.; SULZER, K.R.; STEIGERWALT, A.G.; ROGERS, F.C.; WEYANT, R.S. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v.49, p.839-858, 1999.

BROD, C.S.; MARTINS, L.F.S.; NUSSBAUM, J.R.; FEHLBERG, M.F.B.; FURTADO, L.R.I.; ROSADO, R.L.I. Leptospirose bovina na região sul do Estado do Rio Grande do Sul. **A Hora Veterinária**, v.14, p.15-20, 1994.

CALDAS, E.M. Aglutininas anti-*Leptospira* em hemossoro até animais domésticos no Estado da Bahia, 1990 a 1993. **Arquivos da Escola de Medicina Veterinária da UFBA**, v.16, n.1, p. 49-59, 1993.

CAMPOS JR., A.C.P.; FRENEAU, G.E.; JULIANO, R.S.; ACYPRESTE, C.S.; DIAS FILHO, F.C.; MARTINS, M.E. Prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* em machos bovinos na microrregião de Goiânia. **Ciência Animal Brasileira**, v.7, n.4, p.439-446, 2006.

CERQUEIRA, Gustavo Maia. **Caracterização de *Leptospira* spp. quanto à presença e conservação dos genes da família *lig*: importantes alvos para utilização em vacina e testes de diagnóstico**. 2006. 52f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas.

CERQUEIRA, G.M.; MCBRIDE, A.J.; QUEIROZ, A.; PINTO, L.S.; SILVA, EF, HARTSKEERL RA, REIS MG, KO AI, DELLAGOSTIN OA. Monitoring *Leptospira* strain collections: the need for quality control. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 1, p. 83-87, 2010.

CERQUEIRA, G.M.; PICARDEAU, M. A century of *Leptospira* strain typing. **Infection and Genetic Evolution**, v.9, n.5, p.760-768, 2009.

CHAPPEL, R.J.; GORIS, M.; PALMER, M.F.; HARTSKEERL, R.A. Impact of proficiency testing on results of the microscopic agglutination test for diagnosis of leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 12, p. 5484-5488, 2004.

DELLAGOSTIN, O.A.; GRASSMANN, A.A.; HARTWIG, D.D.; FÉLIX, S.R.; DA SILVA, E.F.; MCBRIDE, A.J. Recombinant vaccines against Leptospirosis. **Human Vaccines**, v. 7, n. 11, p. 1215-1224, 2011.

DORJEE, S.; HEUER, C.; JACKSON, R.; WEST, D.M.; COLLINS-EMERSON, J.M.; MIDWINTER, A.C.; RIDLER, A.L. Assessment of occupational exposure to leptospirosis in a sheep-only abattoir. **Epidemiology and Infection**, v. 139, p. 797-806, 2011.

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

EVANGELISTA, K.V.; COBURN, J. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. **Future Microbiology**, v. 5, n. 9, p. 1414-1425, 2010.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.A.; PEROLAT, P. ***Leptospira* and leptospirosis**. Melbourne, Australia. 1999, p. 255.

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 de São Paulo**, v. 68, n.2, p.29-35, 2001.

FREITAS, D.C. Identificação da leptospirose bovina no Brasil. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária da USP**, v.16, n.1, p. 81-83, 1957.

GALLOWAY, R.L.; LEVETT, P.N. Evaluation of a modified pulsed-field gel electrophoresis approach for the identification of *Leptospira* serovars. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 4, p. 628-632, 2008.

GIORGI, W. TERUYA, J.M.; SILVA, A.S.; GENOVEZ, M.E. Leptospirose: resultados das soroglutinações realizadas no Instituto Biológico de São Paulo durante os anos de 1974/1980. *Biológico*, São Paulo, v.47, n.11, p.299-309, 1981.

GONÇALVES, D.D.; TELES, P.S.; DOS REIS, C.R.; LOPES, F.M.; FREIRE, R.L.; NAVARRO, I.T.; ALVES, L.A.; MULLER, E.E.; DE FREITAS, J.C. Seroepidemiology and occupational and environmental variables for leptospirosis, brucellosis and toxoplasmosis in slaughterhouse workers in the Paraná State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 3, p. 135-140, 2006.

GOUVEIA, E.L; METCALFE, J.; DE CARVALHO, A.L.; AIRES, T.S.; VILLASBOAS-BISNETO, J.C.; QUEIRROZ, A.; SANTOS, A.C.; SALGADO, K.; REIS, M.G.; KO, AI. Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. **Emerging Infection Diseases**, v. 14, n. 3, p. 505-508, 2008.

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. **Infect. Immun.** v.68, n.4, p.2276-2285, 2000.

HAAKE, D.A. Hamster Model of Leptospirosis. **Current Protocols in Microbiology**, Chapter:Unit-12E.2, 2006.

HARTSKEERL, R.A. International Leptospirosis Society: objectives and achievements. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 57, n. 1, p. 7-10, 2005.

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, n. 4, p. 494-501, 2011.

HERRMANN, G.P.; LAGE, A.P.; MOREIRA, E.C.; HADDAD, J.P.A.; RESENDE, J.R.; RODRIGUES, R.O.; LEITE, R.C. Soroprevalência de aglutininas anti-*Leptospira spp.* em ovinos nas Mesorregiões Sudeste e Sudoeste do Estado Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v.34, n.2, p.443-448, 2004.

KINGSCOTE, B.F. Isolation of a hamster-lethal strain of *Leptospira hardjo*. **Canadian Veterinary Journal**, v.21, n.9, p.266, 1980.

KINGSCOTE, B.F. Leptospirosis: an occupational hazard to veterinarians. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 27, n. 2, p. 78-81, 1986.

- KINGSCOTE, B.F. Leptospirosis in two veterinarians. **Canadian Medical Association Journal**, v. 133, n. 9, p. 879-880, 1995.
- KO, A.I.; 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.
- KOHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of pre-defined specificity. **Nature**, p. 256 – 495, 1975.
- LA SCOLA, B.; BUI, L.T.M.; BARANTON, G.; KHAMIS, A.; RAOULT, D. Partial rpoB gene sequencing for identification of *Leptospira* species. **FEMS Microbiology Letters**, v. 263, n. 2, p. 142-147, 2006.
- LAGE, A.P.; LEITE, R.M.H.; THOMPSON, J.A.; BANDEIRA, D.A.; HERRMANN, G.P.; MOREIRA, É.C.; GONÇALVES, V.S.P. Serology for *Leptospira* sp. in cattle of the state of Paraíba, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.74, n.3, p.185-190, 2007.
- LANGONI, H.; MEIRELES, L.R.; GOTTSCHALK, S.; CABRAL, K.G.; DA SILVA, A.V. Perfil sorológico da leptospirose bovina em regiões do Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 61, n.1, p. 37-41, 2000.
- LEVETT, P. N. Leptospirosis: re-emerging or re-discovered disease? **Journal of Medical Microbiology**. v. 48, p. 417-418, 1999.
- LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, p. 296–326.V 14. 2001.
- LILENBAUM, W.; DOS SANTOS, M.R. Leptospirosis in animal reproduction: III. Role of the hardjo serovar in bovine leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v. 37, n. 2, p. 87-92, 1995.
- LILENBAUM, W. Bovine Leptospirosis in Brazil: A Review, **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v.18, n.1, p.9-13, 1996.
- LILENBAUM, W.; SANTOS, M.R. Effect of management systems on the prevalence of bovine leptospirosis. **The Veterinary Record**, v. 138, n. 23, p. 570-571, 1996.
- LILENBAUM, W.; SOUZA, G.N. Factors associated with bovine leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 75, n. 3, p. 249-251, 2003.
- MADRUGA, C.R.; AYCARDI, E.; PUTT, N. Freqüência de aglutininas anti-*Leptospira* em bovinos de corte da região sul de cerrado do Estado de Mato Grosso. **Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, v.32, p.245-249, 1980.
- MAJED, Z.; BELLENGER, E.; POSTIC, D.; POURCEL, C.; BARANTON, G.; PICARDEAU, M. Identification of variable-number tandem-repeat loci in *Leptospira interrogans* sensu stricto. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, p. 539- 545, 2005.

McBRIDE, A.J.; CERQUEIRA, G.M.; SUCHARD, M.A.; MOREIRA, A.N.; ZUERNER, R.L.; REIS, M.G.; HAAKE, D.A.; KO, A.I.; DELLAGOSTIN, O.A. Genetic diversity of the Leptospiral immunoglobulin-like (Lig) genes in pathogenic *Leptospira* spp. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 2, p. 196-205, 2009.

MELO, L.E.H. Prevalência de vacas portadoras de anticorpos antileptospiras em rebanhos produtores de leite do tipo C do Estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA (CONBRAVET), 26., 1999, São Paulo. **Anais do...** São Paulo: 1999.

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

MONAHAN, A.M.; CALLANAN, J.J.; NALLY, J.E. Host-pathogen interactions in the kidney during chronic leptospirosis. **Veterinary Pathology**, v. 46, n. 5, p. 792-799, 2009.

MOREIRA, E.C.; SILVA, J.A.; VIANA F.C.; SANTOS, W.L.; ANSELMO, F.P.; LEITE, R.C. Leptospirose bovina I. Aglutininas anti-leptospiras em soros sanguíneos de bovinos de Minas Gerais. **Arquivos da Escola de Veterinária Universidade Federal Minas Gerais**, v. 31, n.3. p.375-378, 1979.

MOREIRA, E.C. **Avaliação de métodos para erradicação de leptospiroses em bovinos leiteiros. Minas Gerais, Brasil.** 1994. 94p. Tese de Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

NAIMAN, B.M.; BLUMERMAN, S.; ALT, D.; BOLIN, C.A.; BROWN, R.; ZUERNER, R.; BALDWIN, C.L. Evaluation of type 1 immune response in naive and vaccinated animals following challenge with *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo: involvement of WC1+ $\gamma\delta$ and CD4 T cells. **Infection and Immunity**, v.70, p. 6147–6157, 2002.

OLIVEIRA, S.J. Presença de aglutininas anti-*Leptospira* em suínos e bovinos, com e sem sinais de infecção no Rio Grande do Sul. **Boletim Instituto de Pesquisas Veterinária Desidério Finamor**, v. 4, p. 57-64, 1977.

PRESCOTT, J.; GIGNAC, A.; NICHOLSON, V.; MARRIE, T. Prevalence of antibody to leptospiral serovars in veterinarians and slaughterhouse workers in Nova Scotia. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 33, n. 4, p. 276, 1992.

RENESTO, P.; LORVELLEC-GUILLON, K.; DRANCOURT, M.; RAOULT, D. rpoB gene analysis as a novel strategy for identification of spirochetes from the genera *Borrelia*, *Treponema*, and *Leptospira*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.6, p.2200-2203, 2000.

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

RODRIGUES, C.G.; MÜLLER, E.E.; FREITAS, J.C. Infecção por *Leptospira* em bovinos e sua associação com transtornos reprodutivos e condições climáticas. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.5, p.1103-1109, 2007.

SALAÜN, L.; MÉRIEN, F.; GURIANOVA, S.; BARANTON, G.; PICARDEAU, M. Application of multilocus variable-number tandem-repeat analysis for molecular typing of the agent of leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 11, p. 3954-3962, 2006.

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

SILVA, E.F.; BROD, C.S.; CERQUEIRA, G.M.; BOURSCHEIDT, D.; SEYFFERT, N.; QUEIROZ, A.; SANTOS, C.S.; KO, A.I.; DELLAGOSTIN, O.A. Isolation of *Leptospira noguchii* from sheep. **Veterinary Microbiology**, v. 121, n. 2, p. 144-149, 2007.

SILVA, E.F.; MEDEIROS, M.A.; McBRIDE, A.J.; MATSUNAGA, J.; ESTEVES, G.S.; RAMOS, J.G.; SANTOS, C.S.; CRODA, J.; HOMMA, A.; DELLAGOSTIN, O.A.; HAAKE, D.A.; REIS, M.G.; KO, A.I. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. **Vaccine**, v.25, n.33, p.6277-6286, 2007.

SILVA, E.F.; SANTOS, C.S.; ATHANAZIO, D.A.; SEYFFERT, N.; SEIXAS, F.K.; CERQUEIRA, G.M.; FAGUNDES, M.Q.; BROD, C.S.; REIS, M.G.; DELLAGOSTIN, O.A.; KO, A.I. Characterization of virulence of *Leptospira* isolates in a hamster model. **Vaccine**, v. 26, n. 31, p. 3892-3896, 2008.

SILVA, É.F.; CERQUEIRA, G.M.; SEYFFERT, N.; SEIXAS, F.K.; HARTWIG, D.D.; ATHANAZIO, D.A.; PINTO, L.S.; QUEIROZ, A.; KO, A.I.; BROD, C.S.; DELLAGOSTIN, O.A. *Leptospira noguchii* and Human and Animal Leptospirosis, Southern Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, V.15, n.4, p. 621-623, 2009.

SILVA, É.F.; FÉLIX, S.R.; CERQUEIRA, G.M.; FAGUNDES, M.Q. SEIXAS NETO, A.C.P.; GRASSMANN, A.A.; AMARAL, M.G.; GALLINA, T.; DELLAGOSTIN, O.A. Preliminary Characterization of *Mus musculus* –Derived Pathogenic Strains of *Leptospira borgpetersenii* Serogroup Ballum in a Hamster Model. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.83, n.2, p. 336–337, 2010.

TERPSTRA, W.J. Typing leptospira from the perspective of a reference laboratory. **Acta Leidensia**, v.60, n.2, p.79-87, 1992.

TERRY, J.; TRENT, M.; BARTLETT, M. A cluster of leptospirosis among abattoir workers. **Communicable Diseases Intelligence**, v. 24, n. 6, p. 158-160, 2000.

VASCONCELLOS, S.A.; BARBARINI JÚNIOR, O.; UMEHARA, O.; MORAIS, Z.M.; CORTEZ, A.; PINHEIRO, S.R.; FERREIRA, F.; FÁVERO, A.C.M.; FERREIRA NETO, J. S. Leptospirose bovina. Níveis de ocorrência e sorotipos predominantes em rebanhos dos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Rio

Grande do Sul e Mato Grosso do Sul. **Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo**, v. 64, n.2, p.7-15, 1997.

VIEGAS, S.A.R.A.; CALDAS, E. M.; OLIVEIRA, E. M.D. Aglutininas anti-*Leptospira* em hemossoro de animais domésticos de diferentes espécies, no Estado da Bahia, 1997/1999. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.1, n.1, p.1-6, 2001.

YASUDA, H.P. Deoxyribonucleic acid relatdness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with proposals for seven new *Leptospira interrogans*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.37, p.407-415, 1987.

WEISBURG, W.G.; BARNES, S.M.; PELLETIER, D.A.; LANE, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991.

WHO. World Health Organization. **Human Leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control**. 2003.