



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL NOS  
TRÓPICOS**

**AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO RENAL POR LEPTOSPIRAS EM  
OVINOS RESERVATÓRIOS PROVENIENTES DE MATADOURO-  
FRIGORÍFICO**

**DANIELA SANTOS ALMEIDA**

**SALVADOR – BAHIA  
AGOSTO DE 2017**

**DANIELA SANTOS ALMEIDA**

**AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO RENAL POR LEPTOSPIRAS  
EM OVINOS RESERVATÓRIOS PROVENIENTES DE  
MATADOURO-FRIGORÍFICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Ciência Animal nos Trópicos, da Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal nos Trópicos.

Orientadora: Profa. PhD. Melissa Hanzen Pinna Valentim (UFBA)  
Co-Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Estrela Lima (UFBA)

**SALVADOR – BAHIA  
AGOSTO DE 2017**

A447 Almeida, Daniela Santos Almeida

Avaliação de infecção renal por leptospiros em ovinos  
reservatórios provenientes de matadouro frigorífico / Daniela  
Santos Almeida Almeida. -- Salvador, 2017.

68 f. : il

Orientador: Profa. PhD. Melissa Hanzen Pinna Pinna.

Coorientador: Profa. Dra. Alessandra Estrela Lima Lima.

Tese (Doutorado - Pós Graduação em Ciência Animal nos  
Trópicos) -- Universidade Federal da Bahia, Universidade  
Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia,  
2017.

1. Leptospira. 2. ovinos. 3. rins. 4. carreadores. 5. imuno-  
histoquímica. I. Pinna, Profa. PhD. Melissa Hanzen Pinna. II.  
Lima, Profa. Dra. Alessandra Estrela Lima . III. Título.

CDU - 636.32/38

CDD - 632.6

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado não tudo o que pedi, mas tudo aquilo que eu precisava pra chegar até aqui... por isso nunca é demais dizer: “Que Deus nos ajude...”

Aos meus pais, Luzia e Antônio por todo amor dedicado, pelos ensinamentos e por serem o alicerce da minha vida.

À Nivaldo, meu amor, pela paciência, companheirismo, por prestar o apoio moral e psicológico quando desanimei.

À minha orientadora Melissa Hanzen Pinna, pelo apoio, incentivo e por proporcionar a oportunidade de expandir meus conhecimentos.

À minha co-orientadora Alessandra Estrela Lima pela oportunidade de ingresso na PPGCAT e pela colaboração em todas as etapas do trabalho.

À equipe do matadouro-frigorífico Baby Bode pela obtenção das amostras.

Aos técnicos do Laboratório de Bacterioses, Marta Vasconcelos Bittencourt e Evandro Pereira Neto e Marinalva Gonsaga dos Santos, pelo valioso auxílio no desenvolvimento das atividades do projeto.

Aos colegas do Laboratório de Bacterioses, Lucas Paz, Fernanda Santana, Mariele Nascimento, Laerte Marlon, Bruna Lessa, Beatriz Praseres e Evane pelo apoio, torcida e momentos de descontração.

Ao Professor Ricardo Portela pelo precioso auxílio na realização das análises moleculares.

Ao Professor Federico Costa pela disponibilização do anticorpo para realização das imuno-histoquímicas.

À Professora Paula Ristow pelos esclarecimentos e contribuição intelectual.

À Daiana Santos e Ana Amélia Nunes pelo treinamento e realização das imuno-histoquímicas.

À Geórgia França pelos esclarecimentos e por todo apoio,

À Daniele Nascimento pela leituras de lâminas histológicas e fotomicrografias.

Aos técnicos do Laboratório de Patologia Veterinária Evanilda Santos, Wiliane Bispo e Altemar Costa pelo realização do processamento histológico

À todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<p><b>Figura 1.</b> Amplificação por PCR da região do gene <i>lipL32</i> utilizando os <i>primers lipL32</i> 45F e o 286R a partir de amostras de rim de ovinos. Amostras positivas: 63, 161, 162, 164, 170, 171 e 78. Seta: marcador de peso molecular em 240 pb.....</p>	41
<p><b>Figura 2:</b> Fotomicrografia de parênquima renal de ovinos: <b>A e B</b> controle negativo da reação. Notar ausência de imunomarcagem no epitélio e lúmen tubular (magnificação de 400x e 1000x respectivamente); <b>C e D.</b> Secções positivamente marcadas por imuno-histoquímica (IHQ) anti proteína LipL32: <b>C</b> Imunomarcagem positiva de antígeno de leptospira no epitélio e lúmen tubular (magnificação de 400x); <b>D</b> Imunomarcagem nas células epiteliais tubulares e estruturas marcadas em marrom correspondendo ao antígeno de <i>Leptospira</i> aderidas ao lúmen tubular (magnificação de 1000x);.....</p>	42
<p><b>Figura 3:</b> Fotomicrografias de parênquima renal de ovino com imunomarcagem anti proteína LipL32. <b>A.</b> Colonização maciça (muitos túbulos renais marcados por campo) distribuídos em todo o cortex. <b>B.</b> Marcação de túbulo isolado no córtex (seta) (magnificação de 200x). Em ambas, o antígeno de <i>Leptospira</i> foi marcado em marrom nas células epiteliais tubulares distais, com padrão não obstrutivo.....</p>	43
<p><b>Figura 4:</b> Rim de ovino sororeagente para <i>Leptospira</i> sp. <b>A.</b> Superfície natural com áreas multifocais brancacentas variando de 1 a 3 mm de diâmetro (setas). <b>B.</b> Corte sagital do parênquima renal mostrando as áreas esbranquiçadas observadas na superfície natural (setas).....</p>	44
<p><b>Figura 5–</b> Fotomicrografia de parênquima renal de ovino HE. <b>A.</b> Nefrite intersticial (moderada) em região corticomedular (setas); HE (magnificação de 50x). <b>Detalhe.</b> Infiltrado inflamatório mononuclear intersticial HE (magnificação de 400x) . <b>B.</b> Infiltrado linfoplasmocitário (seta vermelha – plasmócito; seta preta - linfócito). <b>Detalhe.</b> Glomerulonefrite proliferativa (seta preta); HE (magnificação de 400x).....</p>	45

## LISTA DE QUADROS

	<b>Página</b>
<b>Quadro 1</b> - Ocorrência de aglutininas anti- <i>Leptospira</i> em ovinos no Brasil de 2002 A 2017, diagnosticados pelo teste de aglutinação microscópica (MAT).....	23

**LISTA DE TABELAS**

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1</b> - Distribuição dos sorovares infectantes e títulos máximos identificados através do MAT em amostras de soro de 194 ovinos abatidos em matadouro-frigorífico.....	41
<b>Tabela 2.</b> Frequência de alterações histopatológicas e associação entre sororeatividade e presença de alterações em animais sororeagentes para <i>Leptospira</i> sp.....	47
<b>Tabela 3.</b> Descrição dos resultados do MAT, IHQ e achados histopatológicos em rins de ovinos positivos na PCR para leptospiros patogênicas.....	47

**LISTA DE ABREVIATURAS**

B.O.D	Demanda Biológica de Oxigênio
CEUA	Conselho de Ética no Uso de Animais
EMJH	Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris
HE	Hematoxilina-eosina
IF	Imunofluorescência
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IHQ	Imuno-histoquímica
IRA	Insuficiência Renal Aguda
Kcl	Cloreto de Potássio
ligA	“Leptospiral immunoglobulin-like A”
LipL	Lipoproteína de membrana
Loa22	Lipoproteína de membrana
LPS	Lipopolissacarídeo
AA	Azul de Alcian
PAS	“ <i>Periodic Schiff Acid</i> ” – ácido periódico de Shiff
MAT	Teste de aglutinação microscópica
OIE	World Organisation for Animal Health
OmpL1	Proteína integral de membrana externa L1
OMPs externa	<i>Outer membrane protein</i> - proteína de membrana externa
PCR	Reação em cadeia da polimerase
OR	<i>Odds Ratio</i>
IC	Intervalo de Confiança
UFBA	Universidade Federal da Bahia
LPV - UFBA	Laboratório de Patologia Veterinária
LABAC – UFBA	Laboratório de Bacterioses



## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO .....	11
ABSTRACT.....	12
INTRODUÇÃO.....	13
REVISÃO DE LITERATURA.....	15
Panorama da ovinocultura no Brasil.....	15
Etiologia.....	17
Classificação e taxonomia.....	17
Morfologia, características de crescimento e cultivo.....	18
Epidemiologia.....	22
Patogenia e aspectos clínicos.....	26
Diagnóstico.....	27
OBJETIVOS.....	32
Objetivo geral.....	32
Objetivos específicos.....	32

## CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO.....	34
MATERIAL E MÉTODOS.....	36
Animais e desenho de estudo.....	36
Isolamento Bacteriológico.....	36
Teste de aglutinação microscópica (MAT).....	37
Identificação Molecular de Leptospiras.....	37
Processamento Histológico e Imuno-histoquímica (IHQ).....	37
Análise Estatística.....	40
RESULTADOS.....	41

DISCUSSÃO.....	48
CONCLUSÃO.....	52
REFERÊNCIAS.....	53
ANEXO 1 – Certificado CEUA.....	67
ANEXO 2 – Relação dos sorovares empregados como antígenos na realização do teste de aglutinação microscópica (MAT).....	68

## RESUMO

O presente estudo objetivou avaliar o padrão histopatológico de lesão renal em ovinos cronicamente infectados e com baixos títulos de anticorpos anti-*Leptospira*, oriundos de matadouro-frigorífico. Na análise sorológica, 24,74% (48/194) apresentaram sororeatividade com título igual ou superior a 100. Títulos de 100 foram predominantes 58,33% (28/48), sendo o título mais elevado de 1.600 e evidenciado em uma amostra 2,08% (1/48). Sorogrupo Serjoe (sv. Hardjo) foi o mais frequente 35,42% (17/48), seguido por Australis (sv Bratislava) e Pomona (sv. Pomona) com 10,42% (5/48) ambos. Foi verificada a presença de DNA leptospírico em 4,12% (8/194) das amostras de rim testadas e nenhuma amostra de urina foi positiva. Cortes histológicos dos rins positivos à PCR foram submetidos à detecção direta, através da técnica de imuno-histoquímica (IHQ) anti-LipL32. A detecção do antígeno de *Leptospira* spp foi evidenciada em 62,5% (5/8) dos rins. A marcação positiva foi observada no citoplasma de células tubulares e na forma de agregados acastanhados aderidos às células epiteliais tubulares e projetados para o lúmen. Infiltrado inflamatório linfoplasmocitário, com predominância de linfócitos e poucos plasmócitos, variando de discreto a moderado, com distribuição multifocal, foi o achado predominante em animais sororeagentes 33,33% (16/48). A demonstração do antígeno leptospírico revestindo os túbulos renais através de IHQ, de ovinos naturalmente infectados confirmados por PCR, caracteriza colonização renal na espécie, com presença de alterações histológicas compatíveis com a leptospirose.

**Palavras chave:** imuno-histoquímica, PCR, *Leptospira* sp., rins, ovelhas, carreadores

## ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the histopathological pattern of renal lesions in chronically infected sheep and with low titers of anti-*Leptospira* antibodies from a slaughterhouse. In the serological analysis, 24.74% (48/194) presented seroreactivity with a titre equal to or greater than 100. Titers of 100 were predominant 58.33% (28/48), the highest titre being 1,600 and evidenced in a sample 2.08% (1/48). Sorogrupo Serjoe (sv. Hardjo) was the most frequent 35.42% (17/48), followed by Autralis (sv Bratislava) and Pomona (sv. Pomona) with 10.42% (5/48) both. The presence of leptospiric DNA was verified in 4.12% (8/194) of the kidney samples tested and no urine sample was positive. Histological sections of PCR-positive kidneys were submitted to direct detection by the anti-LipL32 immunohistochemistry (IHQ) technique. Detection of *Leptospira* spp antigen was evident in 62.5% (5/8) of the kidneys. Positive marking was observed in the cytoplasm of tubular cells and in the form of brownish aggregates adhered to tubular epithelial cells and designed for the lumen. Inflammatory lymphoplasmocytic infiltrate, predominantly lymphocytes and few plasma cells, ranging from mild to moderate, with multifocal distribution, was the predominant finding in seroreagent animals 33,33% (16/48). The demonstration of the leptospiral antigen lining the renal tubules through IHC of naturally infected sheep confirmed by PCR characterizes renal colonization in the species with the presence of histological changes compatible with leptospirosis.

**Key words:** immunohistochemistry, PCR, *Leptospira* sp., Kidneys, sheep, carriers

## INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença infectocontagiosa de caráter zoonótico, causada por espiroquetas do gênero *Leptospira*, que pode acometer diversas espécies de mamíferos, envolvendo roedores, animais domésticos e silvestres em ciclos variáveis, em ambientes onde há a circulação do agente (MWACHUI et al., 2015; ELLIS, 2015). É adquirida através do contato direto com a urina de animais portadores ou de forma indireta pela exposição à água e solo contaminados com leptospiras excretadas na urina de animais reservatórios (HAAKE e LEVETT, 2015).

Em pequenos ruminantes, determina distúrbios reprodutivos, alterações congênitas, abortamentos e mesmo infecções inaparentes, que comprometem a eficiência reprodutiva do rebanho, levando a subfertilidade (MARTINS e LILENBAUM, 2012). Em ovinos, a maioria dos casos está associada, ao sorovar Hardjo, principal estirpe causadora da doença reprodutiva em bovinos no Brasil (GENOVEZ et al., 2011; DIRECTOR et al., 2014).

Os animais infectados podem desenvolver condição de portadores renais, onde as leptospiras instalam-se e multiplicam-se nos túbulos renais e são eliminadas para o meio ambiente por períodos variáveis (ATHANAZIO et al., 2008; BREINER et al., 2009). O *status* de carreador pode se prolongar por toda a vida do animal que mantém o agente com pouco ou nenhum sinal clínico e, com excreção intermitente de leptospiras na urina (ATHANAZIO et al., 2008; ADLER e DE LA PEÑA, 2010; DE OLIVEIRA et al., 2016). Porém, os mecanismos de colonização dos túbulos renais por *Leptospira* ainda são pouco compreendidos. A formação de biofilmes nos túbulos renais poderia favorecer a evasão do sistema imune e, conseqüentemente, a colonização renal crônica, caracterizando-se num processo de evasão e persistência de infecção, visto que, em biofilme, as bactérias encontram-se encobertas por uma matriz exopolimérica que as protege (RISTOW et al., 2008).

Embora diversos inquéritos sorológicos demonstrem que a circulação do agente em rebanhos ovinos no Brasil, a correlação entre sorologia e o estado de portador não é evidente numa base individual e o uso de ferramentas de detecção direta do organismo em tecidos ou do seu DNA é necessário para identificar reservatórios de forma confiável (OTAKA et al., 2012). A identificação de indivíduos carreadores de leptospiras sem sinais clínicos no momento do abate através de técnicas diretas já foi documentada no Brasil (BARBANTE et al., 2014; FORNAZARI et al., 2012; CARVALHO et al., 2011) sendo de notável significância por acarretar risco ocupacional (DORJEE et al., 2011).

Destaca-se que a avaliação histopatológica de parênquima renal de ovinos oriundos de matadouro pode fornecer informações valiosas para uma melhor compreensão dos mecanismos de colonização e, sem o conhecimento adequado da fisiopatogenia e epidemiologia da leptospirose em ovinos, todo o processo de controle e profilaxia da enfermidade pode estar comprometido.

## REVISÃO DE LITERATURA

### Panorama da Ovinocultura no Brasil

A ovinocultura de corte é responsável por uma parcela significativa da produção pecuária mundial, desempenhando um importante papel para a subsistência, sustento econômico e social da população humana, em especial nos países em desenvolvimento, contribuindo para a geração de fonte de renda, fixação do homem em áreas pouco agricultáveis, como é o caso do semi-árido brasileiro (SIMPLICIO, 2011).

Os ovinos são considerados animais rústicos, altamente adaptáveis a uma diversidade de condições climáticas e geográficas, o que lhes confere o título de animais de produção com maior distribuição ao redor do mundo (PUGH; BAIRD, 2011). Apresentam um menor consumo de alimentos e baixas exigências de capital para criação, tornando-os ideais principalmente para pequenos produtores (KOSGEY; OKEYO, 2007). Além disso, apresentam curtos intervalos de geração, alta prolificidade, pequeno porte, e são capazes de utilizar uma grande variedade de alimentos, incluindo resíduos de culturas agrícolas (ALENCAR et al., 2010).

Segundo uma estimativa da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (“Food and Agriculture Organization”, FAO), em 2014, havia cerca de 1,2 bilhões de ovinos ao redor do mundo, onde a maioria (41,9%) dos animais estava distribuída na Ásia, 27,3% na África, 12,3% na Europa, 9,8% na Oceania e finalmente 8,7% nas Américas. Não obstante, aproximadamente 63,3% dos ovinos do mundo estão localizados em países em desenvolvimento, e representam mais de 70% da produção desta espécie (FAOSTAT, 2015).

O Brasil ocupa a 18ª posição no ranking mundial entre os países com rebanhos ovinos. O rebanho nacional registrou em 2014 o número de 17.614.454 cabeças no país, das quais 10.126.799 (57,5%) estão situadas no Nordeste e 5.166.225 (29,3%) na Região Sul. Em termos de tendência, nota-se um aumento do rebanho ovino entre os anos de 2005 a 2014, diferentemente do que se observa para o rebanho caprino, que apresentou diminuição neste mesmo período (IBGE, 2014).

Apesar de possuir mais de 17 milhões de cabeças (IBGE, 2014), o rebanho brasileiro de ovinos apresenta enorme potencial de expansão, em especial no que diz respeito ao

aumento da produtividade, que possibilitaria ao País, em poucos anos, ter um dos maiores rebanhos comerciais do mundo. No cenário atual, ainda há a necessidade de abastecer o mercado interno importando carne ovina de outros países, sendo o Uruguai o maior fornecedor, principalmente nas regiões Nordeste e Centro-Oeste (ALVES et al., 2014).

O estado da Bahia apresenta todas as condições para despontar como grande produtor visto a adaptabilidade das espécies deslançadas as características de nosso estado (ALVES, 2014). Porém, os níveis de produção e produtividade dos rebanhos ainda são inferiores aos observados em países desenvolvidos (SIMPLÍCIO, 2011). O manejo sanitário deficiente encontrado em propriedades do Nordeste contribui para os altos níveis de morbidade e mortalidade que acabam se tornando a principal causa das baixas taxas de desfrute por parte dos criadores nesta região (FILGUEIRA et al., 2009, ALENCAR et al., 2010).

Doenças infecciosas da esfera da reprodução representam grande parcela nos baixos índices de produtividade dos rebanhos de pequenos ruminantes no Brasil (MARTINS e LILENBAUM, 2012). Infecções causadas por agentes virais, bacterianos ou protozoários estão comumente associadas a falhas reprodutivas em pequenos ruminantes (REINA et al., 2009; DEMPSTER et al., 2011), sendo a leptospirose uma das enfermidades bacterianas mais frequentes, que levam à uma queda significativa nos índices produtivos e reprodutivos em rebanhos de pequenos ruminantes (ROSA et al., 2012).

Os prejuízos podem ocorrer de forma direta, com a ocorrência de abortamentos, infertilidade, natimortalidade e nascimento de crias prematuras e fracas, com morte na primeira semana de vida, além de diminuição na produção de leite e no ganho de peso dos animais (ARENT et al., 2013; LILENBAUM et al., 2008), ou de forma indireta, ocasionando prejuízos secundários ao produtor tais como alto custo com serviços veterinários, testes laboratoriais e vacinas (SARMENTO et al., 2012).

Além destas perdas, o potencial zoonótico representado por animais de produção que atuem como reservatórios temporários ou permanentes da leptospirose não pode ser desprezado. Em virtude da relevância para a saúde pública, é classificada como uma doença de risco ocupacional, atingindo diferentes categorias profissionais, tais como funcionários de matadouros-frigoríficos, tratadores de animais e veterinários (DORJEE et al., 2008; DORJEE et al., 2011; DREYFUS et al., 2014; ESMAEILI et al., 2016).



## Etiologia

### Classificação e Taxonomia

Leptospiras (do grego *leptós*: fino, pequeno, delicado e *speira*: espira) são bactérias aeróbicas e espiraladas pertencentes ao reino Bacteria, filo *Spirochaetes*, ordem *Spirochaetales*, família *Leptospiraceae* e gênero *Leptospira*. As espiroquetas compõem um dos poucos grupos bacterianos nos quais as relações filogenéticas são evidentes em nível de características fenotípicas. Dentro do filo *Spirochaetes*, leptospiras formam o grupo mais ramificado em unidades taxonômicas básicas (sorovares), sendo sua morfologia e fisiologia uniformes, mas com constituição fenotípica e genômica diferentes (LEVETT, 2015).

Estudos fenotípicos proporcionaram por décadas uma classificação do gênero em *Leptospira biflexa sensu latu*, que correspondia às espécies saprófitas, não patogênicas e isoladas a partir do meio ambiente e *Leptospira interrogans sensu latu* que compreendia todas as estirpes patogênicas (LEVETT, 2015). Esta classificação tradicional (sorológica) baseada na heterogeneidade dos carboidratos que compõem os lipopolissacarídeos (LPS) da parede celular externa possibilitou a caracterização das espécies de leptospiras em mais de 250 sorovares distintos (FOUTS et al., 2016; EVANGELISTA e COBURN, 2010). Quando antigenicamente relacionados pelo teste de adsorção cruzada, estes sorovares são agrupados por conveniência nos 24 sorogrupos atualmente conhecidos (LEVETT, 2015; OIE 2014).

Com o desenvolvimento de técnicas moleculares, a classificação fenotípica foi aos poucos sendo substituída pela genotípica, baseada na hibridização DNA-DNA, a qual agrupou as leptospiras em diversas espécies genômicas, correspondendo então a grupos com DNA relacionado (MATTHIAS et al., 2008). A classificação atual e mais complexa é detalhada na *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* (LPSN), que divide gênero *Leptospira* em espécies patogênicas (causadoras da doença), saprófitas (ambientais, não causadoras de doença) e intermediárias (de patogenicidade intermediária) e reconhece um total de 23 espécies identificadas e nenhuma subespécie (SMYTHE et al., 2013; LEVETT, 2013, LPSN, 2015). Até o presente momento, foram descritas 22 de leptospiras. Das espécies genômicas, dez são classificadas como patogênicas, *Leptospira alexanderi*, *Leptospira weilii*, *Leptospira borgpetersenii*, *Leptospira santarosai*, *Leptospira kmetyi*, *Leptospira alstonii* (antiga genomoespécie 1), *Leptospira interrogans*, *Leptospira kirschneri* e *Leptospira*

*noguchii*, *Leptospira mayottensis*; cinco como intermediárias, *Leptospira licerasiae*, *Leptospira wolffii*, *Leptospira fainei*, *Leptospira inadai*, *Leptospira broomii* e sete como saprófitas: *Leptospira idonei*, *Leptospira vanthielii* (antiga genomoespécie 3), *Leptospira biflexa*, *Leptospira wolbachii*, *Leptospira terpstrae* (antiga genomoespécie 4), *Leptospira yanagawae* (antiga genomoespécie 5) e *Leptospira meyeri* (LEVETT, 2015; LPSN, 2015).

Segundo Levett (2015), não se atribui correlação entre a classificação sorológica e genotípica uma vez que, nesta última, sorovares patogênicos e não patogênicos ocorrem ao mesmo tempo dentro de várias espécies. Assim, o maior problema da classificação genotípica é que muitas vezes um mesmo serovar pode representar mais de uma espécie genômica, o que torna esta organização confusa para a microbiologia clínica (LEVETT 2015). Por este motivo, a reclassificação do gênero manteve os nomes das espécies *L. interrogans* e *L. biflexa*, para evitar confusão na nomenclatura, referindo-se à *L. interrogans sensu lato* e *L. biflexa sensu lato* quando na antiga nomenclatura sorológica e, *L. interrogans sensu strictu* e *L. biflexa sensu strictu* quando se refere às genomoespécies (LEVETT, 2015).

#### Estrutura, morfologia e características de crescimento e cultivo

Leptospiras são bactérias delgadas, flexíveis, móveis e espiraladas com 0,1 a 0,2 µm de diâmetro e 6 a 20 µm de comprimento. As células típicas têm um gancho em cada extremidade conferindo uma curvatura em formato de “S” ou “C” (TRABULSI, 2015). Apresentam uma estrutura típica de dupla membrana, na qual a membrana citoplasmática e peptidoglicanos da parede celular estão intimamente associadas e são recobertos por uma membrana externa (CAMERON, 2015).

Inserido na membrana externa, o LPS constitui o principal antígeno para *Leptospira*, o qual é estruturalmente e imunologicamente semelhante ao LPS de microrganismos Gram-negativos, desempenhando um papel chave na virulência do agente (EVANGELISTA e COBURN 2010; MURRAY et al. 2015). Adicionalmente, diversas proteínas estruturais e funcionais fazem parte da membrana externa leptospírica. Uma grande diversidade de proteínas, tais como lipoproteínas, estão em abundância na superfície da célula bacteriana. Proteínas integrais de membrana, como a porina OmpL1 e o sistema de secreção tipo dois (SST2) secretina GspD, também estão localizadas na membrana externa de leptospira e têm se mostrado antigênicas (HAAKE e MATSUNAGA, 2010).

No entanto, LipL32 é a lipoproteína integral de membrana externa mais abundante e altamente conservada entre as espécies patogênicas de leptospira, mas não observada nas cepas apatógênicas (HAUK et al., 2011). Embora seu papel ainda não esteja completamente elucidado, estudos sugerem que LipL32 funcione como adesina, o que possibilitaria interações com componentes da matriz extracelular do hospedeiro durante a infecção, tais como laminina, colágenos e fibronectina, além de proteínas plasmáticas como plasminogênio e fibronectina, o que sugere uma importante função na patogênese da leptospirose (CHAEMCHUEN et al., 2011; PINNE e HAAKE, 2013). É detectada em altos níveis em cultivos *in vitro* ou durante a infecção natural, além de ser uma proteína altamente imunogênica, características que a tornam alvo nos estudos que priorizam o desenvolvimento de ferramentas diagnósticas e vacinas (CHANG et al., 2016; MURRAY et al., 2013).

A segunda proteína mais abundante no envelope externo de leptospiros, a lipoproteína Loa22 foi o primeiro fator de virulência geneticamente definido (RISTOW et al., 2007). Estudos subsequentes identificaram a sua função de toxina (ZHANG et al., 2010) e sua expressão na condição de infecção aguda em hamsters e porquinhos da Índia (RISTOW et al., 2007; NALLY et al., 2007).

Em relação às características de crescimento, são microrganismos aeróbios estritos que possuem melhor crescimento em pH levemente alcalino, variando entre 7.2 a 7.6, com temperatura ótima de incubação entre 28 e 30 °C. Fastidiosas e exigentes nutricionalmente, o cultivo *in vitro* é comumente realizado utilizando-se meios líquidos simples, porém enriquecidos com albumina, vitaminas e ácidos graxos de cadeia longa que são utilizados como única fonte de carbono e metabolizados por meio da  $\beta$ -oxidação (CAMERON, 2015).

*Leptospira biflexa* suporta como fontes de carbono os ácidos graxos de cadeias longas ou curtas, saturados ou insaturados, já as leptospiros patogênicas requerem ácidos graxos de cadeia longa e insaturados. Entretanto, quando presente em grande quantidade, esses ácidos tem um efeito tóxico para as leptospiros. Visando minimizar o efeito tóxico dos ácidos graxos de cadeia longa em grandes concentrações, deve-se adicionar albumina bovina no cultivo, responsável por sequestrar os ácidos graxos excedentes e promover a liberação lenta com menor toxicidade. O glicerol pode ser utilizado como outra fonte de carbono, porém, o efeito no crescimento varia entre uma cepa e outra. Os íons de amônia, provenientes dos sais de amônia ou da desaminação de ácidos graxos são as únicas fontes de nitrogênio descritas. Como suplementos nutricionais, destacam-se a tiamina, biotina, fosfato, cálcio e magnésio, ferro, cobre, manganês e sulfato, sendo os três últimos indispensáveis para as cepas

patogênicas (CAMERON, 2015). O crescimento de contaminantes em cultivos de amostras clínicas pode ser inibido pela adição antibióticos tais como 5-fluorouracil, gentamicina, ácido nalidíxico ou rifampicina, os quais se mostraram seletivos para leptospiros patogênicas (CHAKRABORTY et. al., 2011; SAITO et. al., 2013).

O tempo de geração pode variar em função do meio de cultura; idade, quantidade e fase de crescimento do inóculo; e virulência bacteriana (CAMERON; 2015). Em isolados primários o crescimento é fastidioso, podendo ser avaliado, através de microscopia de campo escuro, por até 26 semanas antes de serem descartadas. Porém subculturas mantidas em meio líquido crescem de 10 a 14 dias (ELLIS, 2015; ADLER e DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; EVANGELISTA e COBURN, 2010). Espécies saprófitas, como *Leptospira biflexa*, apresentam tempo de geração médio de quatro horas em cultivos *in vitro*, enquanto que espécies patogênicas, como *Leptospira interrogans*, apresentam tempo de geração médio de seis a oito horas nas mesmas condições. Já leptospiros patogênicos, recém-isolados, demonstram crescimento mais lento, estimado entre quatorze e dezoito horas (CAMERON; 2015).

Em contrapartida, foi demonstrado que algumas cepas patogênicas, tais como a *L. interrogans*, também são capazes de sobreviver por longos períodos em ambientes (solo úmido e água doce) com poucos nutrientes, sendo o pH, a concentração de sal e a viscosidade, fatores críticos para tal (TRUEBA et al., 2004). Todavia, segundo Bulach et al (2006), a espécie patogênica *L. borgpetersenii* depende da transmissão hospedeiro-hospedeiro em razão da inexistência de genes responsáveis pelas funções de transporte e utilização de metabólitos e reconhecimento de características ambientais, necessários para a aquisição de nutrientes e indispensáveis à sobrevivência fora do hospedeiro.

Sugere-se que sobrevivência das leptospiros no meio ambiente se deve à capacidade de formar biofilmes (KUMAR et al., 2015a). Biofilmes são matrizes de substâncias exopoliméricas (EPS) constituídas principalmente por polissacarídios, proteínas, ácidos nucléicos e lipídios que são produzidas pelas bactérias para promover adesão às superfícies e garantir sua própria sobrevivência no ambiente e no próprio hospedeiro (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

A matriz protege os microrganismos da ação de biocidas, agentes antimicrobianos, toxinas, radiação ultravioleta, salinidade, desidratação, oxidação e mudanças ambientais, além de funcionar como um mecanismo de escape do sistema imune. Atualmente, os biofilmes são considerados como o principal modo de vida de procariotos, por conferirem proteção contra

condições desfavoráveis no ambiente externo ou em hospedeiros (FLEMMING e WINGENDER, 2010).

Leptospiras saprófitas formam naturalmente agregados em coleções de água (TRUEBA et al., 2004) e já foram encontradas compondo cerca de 40% de biofilmes mistos formados em unidades hídras de consultórios dentários (SINGH et al., 2003). Ristow e colaboradores (2008) descreveram a formação de biofilmes *in vitro* por leptospiras patogênicas e saprófitas, sendo este caracterizado por um denso emaranhado bacteriano aderido a um suporte abiótico (vidro ou plástico), na interface ar-líquido. Estudos recentes demonstraram que leptospiras patogênicas compõem biofilmes ambientais formados em arrozais em períodos pós-chuvas (KUMAR et al., 2015a). Também foi observada a formação de biofilme pela espécie patogênica *L. interrogans* em associação com *Azospirillum brasilense* (KUMAR et al., 2015b).

A formação de biofilmes por leptospiras pode ter um importante papel na patogenia da leptospirose, porém estudos a este respeito ainda são escassos na literatura. Acredita-se que a colonização a longo prazo dos túbulos contorcidos proximais nos rins das espécies hospedeiras de manutenção do agente seja proporcionada pela matriz do biofilme (RISTOW et al., 2008). Estudos preliminares recentemente realizados demonstraram que a colonização renal em ratos tem a participação de biofilmes (SANTOS, 2015). Brihuega e colaboradores (2012) demonstraram a formação de biofilme *in vitro* e agregados celulares *in vivo* a partir de *L. interrogans* sorovar Pomona recém-isolada de infecção natural em suínos.

Os mecanismos de colonização dos túbulos renais por *Leptospira* ainda são pouco compreendidos. A formação de biofilmes nos túbulos renais poderia favorecer a evasão do sistema imune e, conseqüentemente, a colonização renal crônica, caracterizando-se num processo de evasão e persistência de infecção, visto que, em biofilme, as bactérias encontram-se encobertas por uma matriz exopolimérica que as protege (RISTOW et al., 2008). Algumas hipóteses acerca da evasão do sistema imune nos rins de animais cronicamente infectados, além da formação de biofilmes seriam: diminuição da expressão de antígenos de *Leptospira* durante a colonização renal, pouco infiltrado inflamatório linfocitário, ou inabilidade dos anticorpos IgG em destruir leptospiras (MONAHAN et al. 2009).

## Epidemiologia

Leptospiras são mantidas na natureza por hospedeiros mamíferos reservatórios, os quais são cronicamente infectados por leptospiras nos rins e eliminam a bactéria na urina, contaminando o ambiente. Os roedores são considerados os principais reservatórios da leptospirose no meio urbano, dentre os quais o rato de esgoto (*Rattus norvegicus*) é considerado o principal reservatório urbano no Brasil (DE FARIA et al., 2008; KO et al., 2009; DE OLIVEIRA et al., 2016). Em ambiente rural, outras espécies descritas como reservatórios da leptospirose incluem ovinos, bovinos, caprinos, suínos, equinos e caninos, além de animais silvestres (ADLER e DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; CALDERON et al., 2014; ELLIS, 2015). A transmissão ocorre pelo contato direto com a urina de animais infectados ou indireto com ambientes contaminados, seguido da penetração das leptospiras em lesões de pele ou membranas mucosas (HARTSKEERL et al., 2011).

Cada sorovar tende a ser mantido por um hospedeiro animal específico, sendo então este sorovar considerado adaptado à determinada espécie animal, resultando em doença crônica (ADLER e DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). Quando o sorovar não é adaptado à espécie animal que adquire a infecção, esta pode desenvolver quadros agudos com sintomatologia evidente, comuns em humanos, cães e animais jovens de maneira geral (HARTSKEERL et al., 2011). Os mecanismos de resistência ou susceptibilidade à leptospirose em diferentes hospedeiros são pouco compreendidos e ainda não foram determinados, podendo estar relacionados a fatores do hospedeiro ou do agente etiológico (MONAHAN et al., 2009).

Inquéritos sorológicos realizados em diversos países constataram que a infecção em ovinos por *Leptospira* sp. é frequente e está associada, na maioria dos casos, ao sorovar Hardjo, principal cepa causadora da doença em bovinos (GENOVEZ et al., 2011), sendo mais frequente em rebanhos que utilizam sistemas de manejo intensivo; ou extensivo com criação consorciada de bovinos, nas quais pequenos ruminantes são infectados, preferencialmente, pelo contato direto com urina ou indireto através de solo e água contaminadas (DOS SANTOS et al., 2012). Arent e colaboradores (2014) conseguiram isolar leptospiras dos rins e do útero de ovelhas clinicamente saudáveis que apresentavam sorologia positiva para Hardjo sendo o isolado caracterizado como *L. borgpetersenii* serovar Hardjo.

A leptospirose ovina ocorre no Brasil com diferentes graus de incidência. Diversos estudos demonstraram a presença de anticorpos anti-leptospiras em ovinos criados em vários

estados, incluindo aqueles com histórico de problemas reprodutivos (Quadro 1), podendo estas espécies atuar, assim como os bovinos, como hospedeiros de manutenção para o sorovar Hardjo (LILENBAUM et al., 2009; CORTIZZO et al., 2014; DIRECTOR et al., 2014). Além disso, a transmissão também pode ocorrer diretamente entre os ovinos por meio do contato direto com urina, fluidos e placenta contaminados; além de transmissão venérea (SAGLAM et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2016).

Podemos observar também no Quadro 1 que os estudos de Aguiar e colaboradores (2010) e Silva e colaboradores (2015) registraram elevada ocorrência do sorovar Patoc em ovinos. Contudo, este sorovar é classificado como saprófita e conseqüentemente não patogênico para animais e deve-se considerar a ocorrência de reação cruzada entre diferentes sorogrupos (SUEPAUL et al., 2014). A bateria de antígenos utilizados no MAT deve incluir sorovares representantes de todos os sorogrupos conhecidos além de cepas isoladas localmente (HAAKE e LEVETT, 2015).

**Quadro 1** - Ocorrência de aglutininas anti-*Leptospira* em ovinos no Brasil de 2002 a 2017, diagnosticados pelo teste de aglutinação microscópica (MAT).

<b>Autores</b>	<b>Estado</b>	<b>Ponto de Corte</b>	<b>Frequência</b>	<b>Sorovar predominante</b>
Favero et al., 2002	SP	100	0,7% (2/284)	Icterohaemorrhagiae
Azevedo et al., 2004b	RN	100	3,5% (4/115)	Autumnalis
Herrmann et al., 2004	RS	100	34,26% (466/1369)	Hardjo
Araujo Neto et al., 2005	PB	100	9% (9/100)	Autumnalis
Silva et al., 2007	RS	100	4420,5	Autumnalis
*Lilenbaum et al., 2008	RJ	100	13,7% (40/292)	Hardjo
Aguiar et al., 2010	RO	100	33,33% (47/141)	Patoc
Escócio et al., 2010	SP	100	23,6% (26/110)	Autumnalis
Higino et al., 2010	PB	100	7,5% (6/80)	Autumnalis
Genovez et al., 2011	SP	50	70% (17/24)	Hardjo
Seixas et al., 2011	DF	100	3% (5/157)	Hardjo

Salaberry et al., 2011	MG	100	22,2 % (74/334)	Hardjo
Carvalho et al., 2011	PI	100	28,60% (119)	Autumnalis.
RIZZO et al., 2011	SP	100	22,8% (67/294)	Autumnalis
Marinho et al., 2012	SP	100	19,14% (232/1212)	Hebdomadis
Moraes et al., 2012	PA	100	14,42% (15/104)	Autumnalis
Da Silva et al., 2012 a	SP	100	18.68 (34/182)	Copenhageni
Alves et al., 2012	PB	100	5,41% (69/1.275)	Autumnalis
Rosa et al., 2012	DF	50	4,41 % (6/136)	Hardjo
Fornazari et al., 2012	SP	100	4,5% (21/465)	Hardjo
Carvalho et al., 2014	MA	100	32% (131/379)	Grippotyphosa
*Cortizo et al., 2014	ES	100	10,4% (46/441)	Icterohaemorrhagiae
Barbante et al., 2014	SP	100	23% (23/100)	Autumnalis
Silva et al., 2015	BA	100	38,5 (354/918)	Patoc
Machado et al 2016	PE	100	19,5% (83/426)	Autumnalis
Oliveira et al 2016	PR	100	11,25% (61/542)	Hardjo
Amorim et al., 2016	SP	50	3% (12/400)	Pomona
Costa et al., 2016	PB	100	11.25% (56/500)	Hardjo
Costa et al., 2017	PB	100	8,2 % (4/49)	Javanica
Campos et al., 2017	PI	100	40,5% (136/336)	Icterohaemorrhagiae

\* Rebanhos com problemas reprodutivos

No caso do sorovar Hardjo, considera-se que a transmissão direta de animal para animal, independentemente de fatores ambientais e/ou sazonais seja o mecanismo mais importante para sua manutenção no plantel tornando seu controle mais difícil (LILENBAUM et al., 2008b).

No Brasil, poucos são os relatos de isolamento de estirpes autóctones de leptospiras a partir de pequenos ruminantes (SILVA et al., 2007). Azevedo et al. (2004a) relataram o isolamento de leptospiras a partir de rins de ovinos sem sinais clínicos da infecção no município de Patos, Paraíba, e apesar da caracterização molecular não ter sido realizada, a



identificação presuntiva baseada em métodos sorológicos sugeriu que os isolados pertenciam ao sorogrupo Grippotyphosa. Outro grupo obteve o isolamento de *L. noguchii* em ovelhas no Estado do Rio Grande do Sul, e apontou que esta espécie poderia atuar como hospedeiro de manutenção do sorogrupo Autumnalis, infectando outros animais e seres humanos (SILVA et al., 2007). Mais recentemente, leptospiros foram isoladas de amostras rins e fígado oriundas de matadouro-frigorífico em São Paulo (BARBANTE et al., 2014) e no Rio de Janeiro, leptospiros foram recuperadas a partir do fluido vaginal de ovelhas, evidenciando a potencial transmissão venérea da leptospirose nesta espécie (DIRECTOR et al., 2014).

O estado de portador renal é fundamental para manutenção da cadeia epidemiológica da leptospirose, uma vez que leptospiros colonizam as superfícies livres das células epiteliais dos túbulos proximais do rim (BREINER et al., 2009) podendo persistir infectante por semanas a anos. Quando ocorre adaptabilidade entre o sorovar e o hospedeiro, muitas vezes esta persistência se prolonga por toda a vida do animal, com excreção intermitente de leptospiros na urina (DE FARIA et al., 2007; ATHANAZIO et al., 2008). Leptospiros não sobrevivem em urina ácida, mas podem permanecer viáveis quando esta é alcalina. Assim, animais cuja dieta produz urina com este perfil são relativamente mais importantes como disseminadores do agente do que animais de urina ácida (HARTSKEERL et al., 2011).

Essa eliminação constitui um potencial problema zoonótico, principalmente para indivíduos que apresentam contato direto com animais e suas secreções e excreções, como tratadores, produtores e trabalhadores de matadouros ou frigoríficos (DORJEE et al., 2011; DREYFUS et al., 2014). Em um estudo realizado na Nova Zelândia, verificou-se sororreatividade em funcionários em matadouros de ovinos, o que foi associado à presença de leptospiros viáveis nos rins e na urina dos animais abatidos (DORJEE et al., 2008). Um estudo similar conduzido na cidade de Patos, Estado da Paraíba, evidenciou o risco de infecção leptospírica em trabalhadores de um matadouro de pequenos ruminantes (AZEVEDO et al., 2004). Além disso, abortos e restos placentários podem estar altamente contaminados com o agente, sendo aquele um importante risco para os tratadores dos rebanhos (SAGLAM et al., 2008; ARENT et al., 2013).

## Patogenia e aspectos clínicos

Devido à sua motilidade e características morfológicas específicas as leptospiros penetram ativamente pela mucosa e abrasões da pele (PINNA et al., 2010; HARTSKEERL et al., 2011). O período de incubação da doença varia do segundo ao vigésimo dia pós-infecção. Após a penetração, leptospiros circulam na corrente sanguínea caracterizando fase de bacteremia que pode durar até sete dias. Quando determinado número de bactérias atinge nível crítico ocorrem lesões devido à ação dos componentes celulares tóxicos e consequentemente os sintomas começam a aparecer (ELLIS et al., 2015). A lesão primária consiste em injúria endotelial nos pequenos vasos sanguíneos e, devido à sua ação tóxica, leva a isquemia localizada nos mais diversos órgãos, que pode resultar em necrose tubular renal e hepatocelular, além de danos pulmonares (ADLER e DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; ZUNINO; ROLANDO, 2007). A colonização renal decorre da replicação e persistência da bactéria nos túbulos renais causando nefrite intersticial crônica, com agregados de células inflamatórias ao redor dos túbulos e, como resultado final, instala-se a falência renal, meses ou anos mais tarde (COSTA et al., 2015; HAGIWARA, 2003; ZARAGOZA et al., 2003).

A presença de leptospiros no fígado acarreta em dano hepatocelular, provocando lesões hepáticas típicas tais como perda da arquitetura tecidual, focos de necrose hepatocitária, focos de inflamação, hipertrofia das células de Kupffer e eventualmente presença de células apoptóticas (NALLY et al., 2004, YANG et al., 2006). As leptospiros também podem localizar-se em sinusóides e canálculos biliares, levando à colestase e provocando um aumento de bilirrubina sérica, o que contribui para o quadro de icterícia (DA SILVA et al., 2002). Também pode ser observado aumento das transaminases hepáticas e fosfatase alcalina (DA SILVA et al., 2002; PEREIRA et al., 2005).

O dano pulmonar principal na leptospirose ocorre devido às intensas hemorragias intra-alveolares (NALLY et al., 2004; PEREIRA et al., 2005; YANG et al., 2006), levando à insuficiência respiratória (GOUVEIA et al., 2008). Raras leptospiros são visualizadas nos pulmões, o que pode sugerir outro mecanismo de patogenia neste órgão que não a ação direta do microrganismo (NALLY et al., 2004; YANG et al., 2006). A presença de imunocomplexos em membranas alveolares de cobaias sugere um processo autoimune como etiologia da hemorragia pulmonar observada na leptospirose (NALLY et al., 2004).

Ovinos naturalmente infectados por *Leptospira* spp. podem manifestar a doença com gravidade variável, dependendo da concentração do inóculo, virulência da cepa infectante,

adaptabilidade da cepa ao hospedeiro e resposta imunológica do hospedeiro. A maioria das infecções leptospíricas em pequenos ruminantes são subclínicas (MARTINS et al., 2014). Formas clínicas da doença são observadas principalmente em animais jovens, que apresentam sintomatologia aguda e normalmente grave, caracterizada por icterícia, lesão renal, meningite e, em alguns casos, morte; e fêmeas lactantes ou prenhas, as quais apresentam agalaxia e falhas reprodutivas (ELLIS, 2015). Em relato de surto de leptospirose aguda em rebanho de ovinos mantidos em biotério, ocorrido no estado do Mato Grosso do Sul, com histórico de abortamento prévio, um animal foi a óbito com a identificação de hemorragia, icterícia e hemoglobinúria durante a necropsia (CARNEIRO et al., 2015).

Ovelhas sororreativas podem apresentar problemas reprodutivos; como infertilidade; abortamento, natimortalidade e nascimento de crias prematuras e fracas, com morte na primeira semana de vida. Na maioria dos casos, os abortamentos estão associados às infecções pelo sorovar Hardjo e em menor número, à Pomona, Ballum e Bratislava (DIRECTOR et al., 2014). Síndrome da queda do leite, semelhante a que ocorre em bovinos, também pode ser observada em fêmeas lactantes (ROSA et al., 2012).

## **Diagnóstico**

A inespecificidade dos sinais e a inexistência de lesões patognômicas, torna o diagnóstico da leptospirose difícil, sendo a utilização de exames laboratoriais associados aos dados epidemiológicos essenciais para diagnóstico definitivo da leptospirose (DAHER et al. 2010). A evolução da doença influencia diretamente a escolha do teste diagnóstico e o tipo de amostra clínica que deve ser coletada (PICARDEAU, 2013). Durante a leptospiremia (fase aguda e inicial), o agente pode ser detectado através de métodos diretos, em amostras de sangue total, líquido cefalorraquidiano e outros fluidos do animal. No entanto, nesta fase a resposta imune humoral ainda não está estabelecida e os animais podem não apresentar título de anticorpos detectáveis no teste de soroaglutinação microscópica (MAT) (OIE, 2014). Além disso, a presença de leptospiras no sangue corresponde a uma fase transitória que, normalmente, dura poucos dias, acompanhada de posterior decréscimo da carga bacteriana detectável. (ZUERNER, 2015). Além disso, a dinâmica da carga bacteriana inicia-se, de forma crescente na corrente sanguínea e, na medida em que observamos um decréscimo na mesma inicia-se o estabelecimento de colonização renal persistente. Desta forma, durante a

fase de leptospirúria, as leptospiras são liberadas intermitentemente na urina e dificilmente detectadas no sangue, sendo observados títulos sorológicos (OIE, 2014).

A observação direta de leptospiras pode ser realizada por microscopia de campo escuro a partir da de lâminas confeccionadas com materiais biológicos como sangue, urina, tecidos e LCR (líquido cefalorraquidiano) (FAINE, 1999; KRAMER et al., 1994). A vantagem da observação direta é a rapidez e a possibilidade de diagnóstico precoce. No entanto, esse método tem pouca aplicação na rotina clínica devido à baixa sensibilidade e à necessidade de técnico treinado e microscópico de campo escuro. São necessários entre  $10^2$  e  $10^6$  leptospiras por mililitro no sangue (PICARDEAU, 2013) e  $10^7$  por mililitro na urina para que as leptospiras possam ser visualizadas por microscopia de campo escuro (ROSSETI e BOGGIA, 2014). Além disso, a subjetividade na leitura ocorre com frequência gerando falsos positivos, uma vez que no sangue e em tecidos vários artefatos, redes de fibrina e debris celulares podem ser facilmente confundidos com leptospiras. Na urina, além de serem liberadas de forma intermitente, podem sofrer lise pelo pH ácido da urina. Desta forma, resultados negativos de exames diretos não excluem a possibilidade de infecção por leptospiras e não devem ser considerados com valor definitivo, mas como um adjuvante de outros métodos de diagnóstico (TOYOKAWA et al., 2011).

Impregnação não específica com sais de prata Warthin-Starry (WS) e métodos de detecção específicos como a imunofluorescência direta (IF) e a imuno-histoquímica (IHQ) possibilitam a visualização direta de leptospiras e podem ser aplicados para aumentar a sensibilidade da detecção direta por microscopia no sangue na urina e em tecidos. IF possibilita a identificação de antígenos de membrana externa sendo a dificuldade de conservar resultados e necessidade de microscópio de fluorescência são as principais desvantagens da técnica. Imuno-histoquímica tem sido utilizada para avaliar a infecção por leptospiras em diferentes tecidos animais fixados em formalina e embebidos em parafina, (SAGLAM et al., 2008), sendo útil quando há necessidade de diagnóstico rápido ou avaliação retrospectiva da infecção em material patológico que não é adequado para a cultivo ou aplicação de técnicas moleculares (OIE, 2014). Adicionalmente, estudos imuno-histoquímicos tem utilizado anti-LipL32 para avaliar a distribuição de antígenos de leptospira em diversos órgãos e caracterizar o estado de portador renal em possíveis carreadores (SANTOS et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2016).

O isolamento bacteriológico é considerado padrão ouro e diagnóstico definitivo da leptospirose (OIE, 2014). Leptospiras podem ser isoladas do sangue, tecidos e líquido

cefalorraquidiano durante os primeiros 7 a 10 dias de infecção e da urina a partir da segunda semana da doença. Embora a especificidade seja de 100%, a técnica possui baixa sensibilidade (14,3-50%). O meio de cultura com o material inoculado precisa ser mantido entre 28 e 30°C e submetido a análises por microscopia de campo escuro semanalmente por até 26 semanas antes de ser descartada como negativa, em função do crescimento fastidioso das leptospiras. Pode haver um pequeno número de leptospiras viáveis em amostras contaminadas ou autolíticas, sendo a contaminação dos cultivos por outros microrganismos de crescimento rápido um problema frequente (ELLIS et al., 2015).

A liberação intermitente de leptospiras através da urina de animais portadores e a existência de estirpes de crescimento lento com reduzida capacidade de sobreviver fora de um hospedeiro mamífero, também podem explicar as baixas taxas de isolamento (LEHMANN et al., 2014). Mesmo com as limitações, o isolamento do patógeno é importante, pois além de fornecer o diagnóstico definitivo, permite caracterização sorológica e genômica do isolado. Esses dados têm utilidade epidemiológica e auxiliam na identificação de potenciais reservatórios animais na natureza, orientando as estratégias de controle e prevenção (CERQUEIRA e PICARDEAU, 2009; ADLER e DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

Outra forma de demonstrar a presença de leptospiras em amostras clínicas é o uso de métodos moleculares baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR). Esta metodologia apresenta elevada sensibilidade e especificidade, podendo detectar até dez leptospiras por mililitro de urina. Apesar disso, necessita de grande aparato tecnológico e pessoal treinado para realização do teste (STODDARD et al., 2009). A PCR é uma ferramenta cada vez mais utilizada na rotina de diagnóstico da leptospirose animal (PINNA et al., 2011). Em pequenos ruminantes tem sido de grande importância para identificação de animais carreadores, bem como no controle da enfermidade (DIRECTOR et al., 2014; LILENBAUM et al., 2008)

Dentre os diversos testes que se baseiam na detecção de anticorpos já padronizados, o teste de aglutinação microscópica (MAT) é considerado padrão ouro, sendo teste de referência, recomendado pela Organização Mundial da Saúde Animal (“World Organisation for Animal Health”, OIE) (OIE, 2014). O MAT apresenta como principais vantagens ser de baixo custo e ter elevada sensibilidade, sobretudo entre a segunda e quarta semana chegando a 82%, detectando IgM e IgG. Vale ressaltar que na primeira semana a sensibilidade é de 41%. (MUSSO e LA SCOLA, 2013). Ainda, presume o sorogrupo envolvido na infecção a partir do sorogrupo que sofreu máxima aglutinação com o soro testado (MURRAY et al. 2011; SMYTHE et al. 2009). Resultados falso-negativos nesta técnica podem ser observados

especialmente em casos de infecções recentes, onde o sistema imune ainda não produziu imunoglobulinas suficientes para detecção. A não utilização do sorovar (ou representante do sorogrupo) infectante ainda pode favorecer a presença de falsos negativos. (MUSSO e LA SCOLA, 2013).

Adicionalmente, ressalta-se a necessidade de ser realizado em laboratórios de referência com pessoal treinado e o alto custo para manutenção de um painel de leptospiros vivas que representem a diversidade antigênica de cepas que ocorrem no local presumível de ocorrência da infecção são algumas limitações da técnica (PICARDEAU, 2014). Por isso, é recomendável, que o painel de cepas utilizadas no teste inclua leptospiros de cada um dos 24 sorogrupos de leptospiros, além de isolados do local onde o teste está sendo realizado (ELLIS, 2015.).

O MAT identifica por microscopia de campo escuro a aglutinação do soro testado com antígenos vivos de leptospira (OIE 2014). Após a incubação, a mistura soro-antígeno é examinada microscopicamente para observação de aglutinação. Uma reação é considerada positiva quando menos de 50% das leptospiros estão livres, em comparação a um controle apenas com antígenos vivos. Para fins de trânsito internacional de animais um título  $\geq 100$  é considerado como positivo (OIE, 2014) e em muitos inquéritos soroepidemiológicos o mesmo título é usualmente atribuído à exposição prévia ao agente, sendo utilizado na triagem inicial dos soros testados. Considera-se caso confirmado pelo MAT, aquele que apresenta soroconversão, ou uma variação sorológica nos títulos de anticorpos de quatro vezes ou mais em amostras pareadas, independentemente do tempo entre amostras (HAAKE e LEVETT 2015). O provável sorogrupo infectante é aquele que apresenta pelo menos 50% de leptospiros aglutinadas na maior diluição. Se mais de um sorogrupo apresentar o mesmo título o resultado é considerado como reação mista e o provável sorogrupo infectante não é determinado (OIE, 2014).

Sendo assim, torna-se importante a investigação da leptospirose em ovinos encaminhados ao abate, naturalmente infectados e sem sinais clínicos. Adicionalmente buscase associar a ocorrência de infecções crônicas (carreador renal) com baixos títulos de anticorpos anti-*Leptospira* para reforçar a hipótese de que a colonização no parênquima renal diminua a sinalização para o sistema imune, o que se traduz por menor afluxo de células inflamatórias para o local. Estes animais são importantes do ponto de vista epidemiológico uma vez que não são facilmente detectados em testes sorológicos de rotina e são fontes de

propagação da infecção para outros animais em seu ambiente natural, além do risco ocupacional por se tratar de uma zoonose.

## OBJETIVOS

### Objetivo Geral

O objetivo geral foi caracterizar em ovinos a infecção por de *Leptospira* spp. por abordagem multidisciplinar envolvendo a análise sorológica, bacteriológica e molecular, bem como, de forma inovadora, estudar a o padrão de infecção crônica no parênquima renal em ovinos abatidos em matadouro-frigorífico localizado na Bahia.

### Objetivos Específicos

1. Caracterizar a infecção por *Leptospira* spp. em ovinos assintomáticos abatidos em matadouro-frigorífico na Bahia
2. Avaliar os padrões de infecção renal
3. Avaliar a presença de biofilme renal por leptospiras



## CAPITULO I

### **INVESTIGAÇÃO DA INFECÇÃO CRÔNICA POR *Leptospira* spp. EM OVINOS ASSINTOMÁTICOS ABATIDOS EM MATADOURO-FRIGORÍFICO**

## INTRODUÇÃO

Leptospiras são mantidas na natureza por hospedeiros mamíferos reservatórios, os quais são cronicamente infectados nos rins e eliminam a bactéria na urina, contaminando o ambiente (ADLER e DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). Os roedores são considerados os principais carreadores do agente, dentre os quais o rato de esgoto (*Rattus norvegicus*) destaca-se o como reservatório de maior importância nos ecossistemas urbanos no mundo (COSTA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2016). Em ambientes rurais, outras espécies descritas como reservatórios da leptospirose incluem ovinos, bovinos, caprinos, suínos, equinos e caninos, além de animais silvestres (ADLER e DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; CALDERON et al., 2014; ELLIS, 2015). A transmissão ocorre pelo contato direto com a urina de animais infectados ou indireto com ambientes contaminados, seguido da penetração das leptospiras em lesões de pele ou membranas mucosas (HARTSKEERL et al., 2011).

Diversos inquéritos sorológicos evidenciaram que a infecção em ovinos por *Leptospira* sp. é frequente e está associada, na maioria dos casos, ao sorovar Hardjo (COSTA et al., 2016; ARENT et al., 2014; FORNAZARI et al., 2012; GENOVEZ et al., 2011). *Leptospiras* tem sido detectadas por métodos diretos na urina e rins de ovelhas, o que caracteriza a espécie como susceptível à doença e possível reservatório crônico da infecção (ARENTE et al., 2013, CARVALHO et al., 2011).

Os mecanismos de resistência ou susceptibilidade à leptospirose em diferentes hospedeiros são pouco compreendidos e ainda não foram determinados, podendo estar relacionados a fatores do hospedeiro ou do agente etiológico (MONAHAN et al., 2009). A formação de biofilmes nos túbulos renais poderia favorecer a evasão do sistema imune e, conseqüentemente, a colonização renal crônica, caracterizando-se num processo de evasão e persistência de infecção, visto que, em biofilme, as bactérias encontram-se encobertas por uma matriz exopolimérica que as protege (RISTOW et al., 2008). Brihuega e colaboradores (2012) demonstraram a formação de biofilme *in vitro* e agregados celulares *in vivo* a partir de *L. interrogans* sorovar Pomona recém-isolada de infecção natural em suínos.

Estudos relatam a predominância de baixos títulos de anticorpos anti-*Leptospira* associados à infecção em rebanhos ovinos ou amostras provenientes de matadouro-frigorífico (CAMPOS et al., 2017; COSTA et al., 2017; AMORIM et al., 2016). Entretanto, o teste de aglutinação microscópica (MAT) utilizado para diagnóstico sorológico não é considerado um método adequado para identificar carreadores em nível individual, uma vez que animais

infectados podem apresentar títulos baixos ou indetectáveis, havendo necessidade de utilização de métodos diretos de diagnóstico para detecção de carreadores (OTAKA et al., 2012). DNA leptospírico foi detectado em urina e diferentes amostras provenientes de animais vivos (urina e sêmen) ou após o abate (fragmentos de órgãos), para confirmar o estado de ovinos como portadores (BARBANTE et al., 2014; DIRECTOR et al., 2014; ARENT et al., 2013; FORNAZARI et al., 2012).

As histotécnicas tem sido utilizadas tanto para a detecção de antígeno leptospírico em diversos tecidos, pela utilização de imunohistoquímica (IHQ) (CARVALHO et al., 2011; SAGLAM et al., 2008), quanto para a investigação da formação de biofilme in vivo por leptospiros patogênicos (SANTOS et al., 2015, SANTOS, 2015).

O presente estudo objetivou avaliar o padrão histopatológico de lesão renal em ovinos cronicamente infectados e com baixos títulos de anticorpos anti-*Leptospira*, oriundos de matadouro-frigorífico

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Animais e amostras**

Os protocolos da pesquisa foram aprovados na Comissão de Ética no Uso de Animais do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, sob o número 21/2013 (Anexo 01).

Foram obtidas amostras provenientes de 194 ovinos encaminhados para abate em matadouro-frigorífico, sob inspeção federal, situado no município de Feira de Santana, Bahia. A coleta de amostras foi realizada durante a linha de abate, em oito visitas ao matadouro entre janeiro de 2014 e dezembro de 2015, com intervalo médio entre as coletas de três meses. Imediatamente após o abate de cada animal foram obtidas amostras de sangue por meio da venopunção, de forma asséptica, para atender à realização do teste sorológico. Em seguida, foi realizada a colheita, durante a linha de abate, de urina (cistocentese) e de um fragmento do córtex e medula para realização de provas bacteriológicas, histológicas e moleculares.

### **Isolamento bacteriológico**

Imediatamente após a cistocentese, 100 microlitros de urina foi semeada, em tubos de vidro estéreis contendo 5 mL de meio líquido EMJH® (Difco, BD, Franklin Lakes, NJ, USA), EMJH acrescido de 5-fluoracil 100mg/ml (5FU) e meio semissólido Fletcher (Difco, BD, Franklin Lakes, NJ, USA), na proporção de 1:100. Os cultivos foram mantidos em temperatura ambiente por um período máximo de 3 horas até a chegada ao laboratório, onde foram incubados em estufa B.O.D., a 28°C. As culturas foram examinadas em microscopia de campo escuro após 24h e posteriormente, semanalmente por, no mínimo, 16 semanas (CAMERON, 2015)

### **Teste de Aglutinação Microscópica (MAT)**

O sangue coletado de todos os 194 animais animais foi identificado, resfriado e transportado até o laboratório, para centrifugação e obtenção de soro, que foi aliquoteado e estocado em tubos plásticos do tipo Eppendorf® a -20° C para posterior análise. O diagnóstico sorológico para leptospirose foi realizado de acordo com a recomendação técnica da Organização Internacional de Epizootias (OIE), por meio do teste de aglutinação microscópica (MAT), conforme previamente descrito (OIE, 2014). Foi utilizada uma bateria de antígenos vivos composta de 24 sorovares distintos de leptospiros, representando os 24 sorogrupos conhecidos (Anexo 2). Brevemente, os antígenos vivos utilizados foram mantidos em meio EMJH. As cepas de referência foram cultivadas em EMJH por 5 -10 dias a 30°C em estufa B.O. D. (Eletrolab, São Paulo, SP) até a fase exponencial de crescimento (aproximadamente 10<sup>8</sup> leptospiros por mililitro). Para cada reação utilizou-se como controle negativo solução salina tamponada (NaCl 0,9%). Cada amostra de soro foi inicialmente diluída a 1:50 em solução salina tamponada.

As leituras foram realizadas em microscópio óptico (Zeiss, Standort Göttingen, Vertrieb, Alemanha), com condensador seco de campo escuro, em magnificação de 200 vezes, observando-se a formação de aglutinações. As amostras sorológicas foram inicialmente analisadas na diluição de 1:100 e, aquelas que apresentarem nível de aglutinação igual ou superior a 50% foram então novamente diluídas numa razão geométrica de dois. O título sorológico foi representado pela recíproca da maior diluição que apresentou resultado positivo. Adicionalmente, o maior título alcançado foi utilizado para identificar o sorovar infectante. Os animais foram considerados positivos quando apresentaram títulos  $\geq 100$  (OIE, 2014). Na ocorrência de sororreatividade para mais de um sorovar, o que apresentou maior frequência dentre o conjunto de amostras analisado por coleta, foi considerado o infectante.

### **Identificação molecular de leptospiros**

O DNA de um fragmento de rim (1 cm<sup>3</sup>) e da urina (1 mL) proveniente de cada animal foi extraído pelo *kit* Wizard SV Genomic DNA Purification System (Promega, Madison, EUA). No ensaio da PCR para a detecção do gene *lipL32* (presente apenas em leptospiros patogênicos) foram empregados os iniciadores *lipL32*-45F (5'-AAG CAT TAC

CGC TTG TGG TG-3') e *lipL32-286R* (5'-GAA CTC CCA TTT CAG CGA TT-3') (STODDARD et al., 2009). Utilizou-se um volume de 25 µL de solução contendo: 300 µM de cada desoxinucleotídeo (Invitrogen, Carlsbad, EUA), 75 mM de TrisHCl, 50 mM de KCl, 20 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2,4 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,6 µM de cada iniciador (Integrated DNA Technologies, Coralville, EUA), 1 U Taq DNA polimerase (Biotools B&M Labs, SA, Valle de Tobalina, Espanha) e 3,5 µL de DNA molde.

Para cada conjunto de amostras, água ultrapura foi utilizada como controle negativo, enquanto 10 fg de DNA extraído de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 foi usado como controle positivo. Todas as reações foram realizadas no termociclador Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Após uma desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, o perfil da PCR foi definido da seguinte forma: 30 segundos de desnaturação a 94°C, 30 segundos de anelamento do *primer* a 53 °C e 1 minuto de extensão do *primer* a 72 °C, com um total de 35 ciclos, com uma extensão final a 72°C durante 5 minutos (STODDARD et al., 2009). O volume total de cada amostra foi analisado por eletroforese em gel de agarose (2%), corado com brometo de etídio e as bandas de DNA foram visualizadas sob luz ultravioleta. O tamanho esperado do amplicon foi de 240pb, variando ligeiramente entre as diferentes espécies de *Leptospira*.

### **Processamento Histológico e Imuno-histoquímica (IHQ)**

Fragmentos de parênquima renal medindo 2,0 x 2,0 x 0,5 centímetros foram coletados de todos os animais em frascos contendo formol neutro tamponado a 10% para fixação. Posteriormente foram processados segundo a técnica rotineira de inclusão em parafina (PROPHET, 1992).

Foram realizados cortes sequenciais de 2 µm de espessura, os quais foram processados para a coloração rotineira Hematoxilina-Eosina (HE). No entanto, as amostras cm PCR positiva foram triadas para realização de imunohistoquímica anti-*Leptospira* (IHQ), segundo Croda e colaboradores (2008), além de colorações especiais PAS e Alcian Blue.

Para a realização de IHQ em amostras positivas na PCR, os cortes histológicos com 2 µm de espessura, foram dispostos em lâminas de vidro (26 mm x 76 mm), previamente silanizadas. A seguir, foi realizada a desparafinização em dois banhos de xilol a temperatura ambiente, cada um com 10 minutos. Os cortes foram reidratados em cadeia de etanol (álcool

absoluto I, álcool absoluto II, álcool 95%, álcool 70%, álcool 50%) durante 5 minutos cada. Após essa etapa, realizou-se lavagem em água destilada. A seguir, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena tecidual, em solução de peróxido de hidrogênio: uma parte de peróxido de hidrogênio a 30% e nove partes de metanol absoluto, por 15 minutos. Logo após foi realizada uma lavagem em água destilada e uma lavagem em PBS, ambos por 1 minuto. A seguir, foi realizado o bloqueio de ligações inespecíficas com duas incubações com BSA 1% (soro albumina bovina), ambas com 10 minutos cada. Seguiu-se, então, a incubação com o anticorpo primário (anti-LipL32 e soro controle negativo de coelho) diluídos a 1:1000 em BSA 1% (OLIVEIRA et al., 2016). A solução foi colocada sobre os cortes permanecendo por uma hora a 37 °C em câmara úmida. Após essa etapa os cortes foram lavados três vezes com PBS, por cinco minutos cada, e incubados por 15 minutos com anticorpo secundário (Histostain Invitrogen®), a temperatura ambiente. Após, os cortes foram novamente lavados três vezes com PBS, cinco minutos cada. Após essa etapa seguiu-se a incubação 37 °C com a solução de streptavidina-peroxidase durante 10 minutos em temperatura ambiente sendo novamente lavadas duas vezes em PBS por cinco minutos. As reações foram reveladas pelo sistema cromatográfico DAB (Kit DAB Invitrogen) por 15 segundos, que produz um precipitado acastanhado e torna a reação visual ao microscópio de luz. Após essa etapa os cortes foram contracorados com Hematoxilina de Mayer por 10 segundos, lavados em imersão de água, desidratados em três banhos em álcool absoluto, desparafinizados em três banhos de xilol, e montados com bálsamo do Canadá e lamínula. Para a validação da técnica de IHQ, foi utilizado soro de coelho para controle negativo da reação, oriundos de Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, FIOCRUZ/BA. Para o controle positivo utilizou-se secção histológica de rim de *Rattus norvegicus* naturalmente infectado oriundo do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, FIOCRUZ/BA. A aquisição de imagens de microscopia ótica foi realizada utilizando câmera digital *Spot Insign Color* adaptada a um Microscópio Olympus BX-40, utilizando-se o *software* de captura SPOT® versão 3.4.5 e o *software* Corel DRAW® versão 7.468.

Uma vez identificados túbulos renais positivos em IHQ anti-LipL32 realizamos então a co-localização dos mesmos túbulos concomitantemente positivos para coloração específica de carboidratos, em sequências renais (SANTOS et al., 2015). Adicionalmente, foram empregadas técnicas histoquímicas de ácido-periódico Schiff (PAS) e azul de Alcian (AA), ambos segundo recomendações do fabricante Kit comercial Easy Patch (Bio-óptica, Milão, Itália) para as respectivas técnicas, para a identificação de exopolissacarídeos associados à

presença de bactérias, o que caracteriza a formação de biofilme (PARSEK; SINGH, 2003; BJARNSHOLT et al., 2009; SANTOS et al., 2017).

### **Análise Estatística**

A associação entre a sororeatividade no MAT e presença de lesão renal foi obtida através do teste Qui-quadrado ou do teste exato de Fisher. Para determinação do risco de ocorrência de alterações histopatológicas entre animais sororeagentes e não reagentes no MAT, *Odds Ratio* (OR) e os seus intervalos de confiança de 95% (IC) foram calculados. Os resultados foram analisados usando o software Epi info 7 TM (versão 7.2.1.0, CDC Atlanta, EUA).



## RESULTADOS

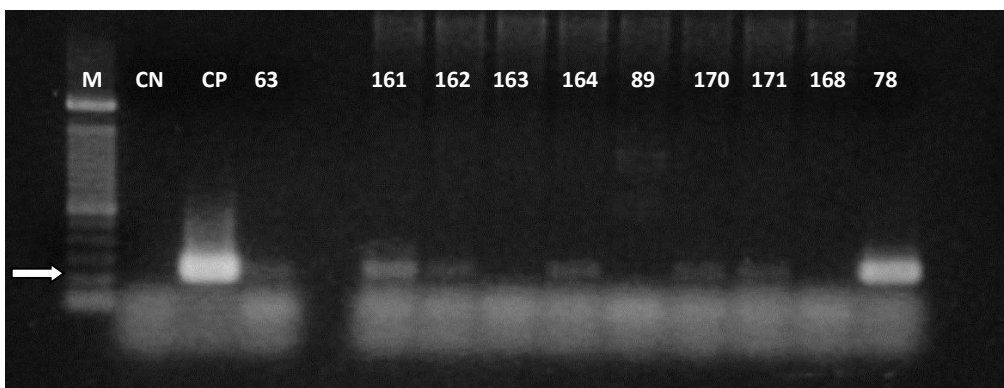
Dos 194 animais examinados pelo MAT, 24,74% (48/194) apresentaram sororreatividade, com ponto de corte igual a 100. Títulos de 100 foram predominantes, representando 58,33% (28/48) das reações positivas, seguido de títulos de 200-33,33% (16/48) e títulos de 400-6,25% (3/48). O título mais elevado foi de 1.600 para o sorovar Hardjo evidenciado em uma amostra (correspondendo a 2,08%). O sorovar Hardjo (Sorogrupo Sejroe) foi o mais prevalente, representando 35,42% (17/48) das amostras reativas, seguido por Bratislava e Pomona, ambas com 10,42 (5/48) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Distribuição dos sorovares infectantes e títulos máximos identificados através do MAT em amostras de soro de 194 ovinos abatidos em matadouro-frigorífico.

Sorovar	Títulos				Total (%)
	100	200	400	>800	
Hardjo	7	8	1	1	17 (35,41%)
Bratislava	2	2	1	-	5 (10,42%)
Pomona	5	-	-	-	5 (10,42%)
Hebdomadis	2	2	-	-	4 (8,33%)
Ballum	1	2	-	-	3 (6,25%)
Cop M20	2	1	-	-	3 (6,25%)
Bataviae	2	-	-	-	2 (4,17%)
Cynopteri	2	-	-	-	2 (4,17%)
Djasiman	2	-	-	-	2 (4,17%)
Wolffi	-	1	1	-	2 (4,17%)
Australis	1	-	-	-	1 (2,08%)
Lousiana	1	-	-	-	1 (2,08%)
Pyrogenes	1	-	-	-	1 (2,08%)
<b>Total (%)</b>	<b>28</b> <b>(58,33%)</b>	<b>16</b> <b>(33,33%)</b>	<b>3</b> <b>(6,25%)</b>	<b>1</b> <b>(2,08%)</b>	<b>48</b> <b>(100 %)</b>

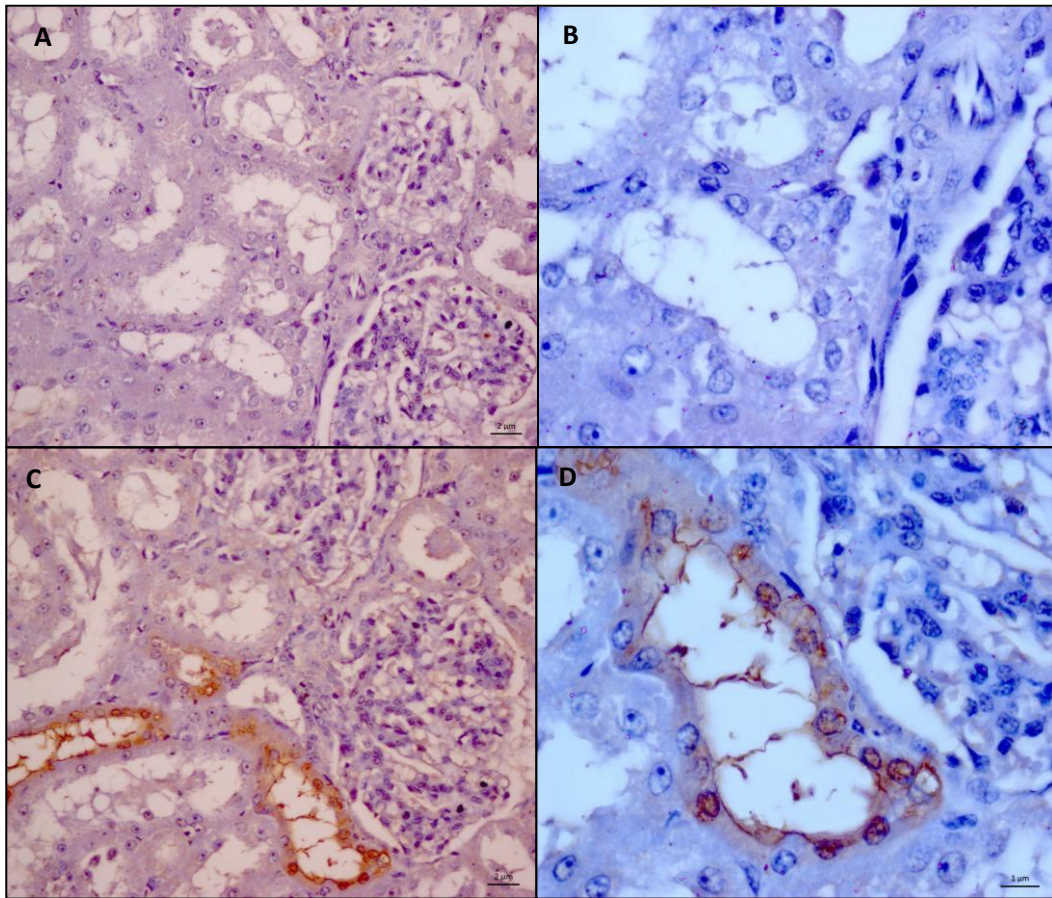
O isolamento bacteriano não foi obtido nos 194 cultivos de urina e de rim. Na análise molecular, DNA leptospírico foi identificado em 4,12% (8/194) das amostras de rim testadas (Figura 1) e nenhuma amostra de urina foi positiva.

**Figura 1.** Amplificação por PCR da região do gene *lipL32* utilizando os *primers lipL32* 45F e o 286R a partir de amostras de rim de ovinos. Amostras positivas: 63, 161, 162, 164, 170, 171 e 78. **Seta:** marcador de peso molecular em 240 pb



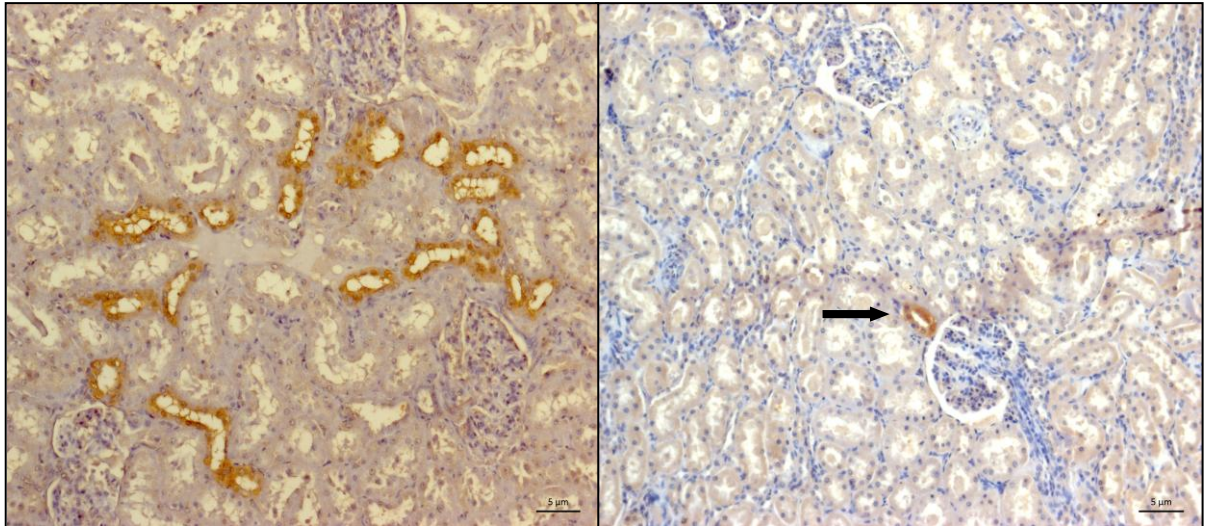
Houve detecção do antígeno LipL32 de *Leptospira* através da técnica de IHQ em 62,5% (5/8) dos fragmentos de rins triados pela PCR. As imunomarcações foi observada no citoplasma de células epiteliais tubulares na forma de depósitos acastanhados aderidos às células epiteliais tubulares e se projetavam para o lúmem, porém com padrão não obstrutivo (Figura 2).

**Figura 2:** Fotomicrografia de parênquima renal de ovinos: **A e B** controle negativo da reação. Notar ausência de imunomarcagem no epitélio e lúmen tubular (magnificação de 400x e 1000x respectivamente); **C e D.** Secções positivamente marcadas por imuno-histoquímica (IHQ) anti proteína LipL32: **C** Imunomarcagem positiva de antígeno de *leptospira* no epitélio e lúmen tubular (magnificação de 400x); **D** Imunomarcagem nas células epiteliais tubulares e estruturas marcadas em marrom correspondendo ao antígeno de *Leptospira* aderidas ao lúmen tubular (magnificação de 1000x);



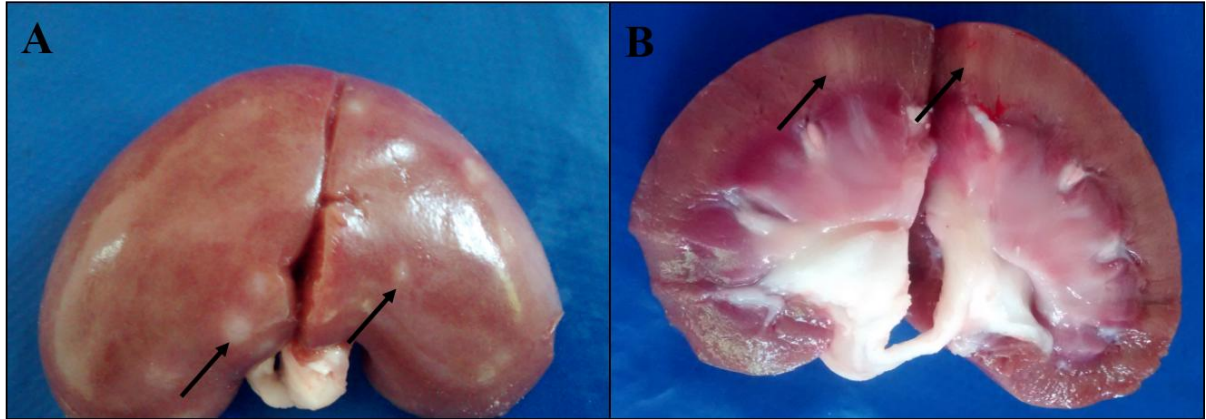
Em relação à distribuição dos túbulos renais marcados na IHQ, um dos animais apresentou colonização renal generalizada com túbulos marcados em todo o córtex e quatro apresentaram um ou mais túbulos marcados por campo, em aglomerados, e em diferentes regiões do córtex (Figura 3).

**Figura 3.** Fotomicrografias de parênquima renal de ovino com imunomarcação anti proteína LipL32. **A.** Colonização maciça (muitos túbulos renais marcados por campo) distribuídos em todo o córtex. **B.** Marcação de túbulo isolado no córtex (**seta**) (magnificação de 200x). Em ambas, o antígeno de *Leptospira* foi marcado em marrom nas células epiteliais tubulares distais, com padrão não obstrutivo.



As técnicas de Azul de Alcian e PAS resultaram negativas para marcação de componentes da matriz do biofilme. Na avaliação macroscópica, alterações foram evidentes em dois dos 194 (1,03%) rins avaliados, reagentes no MAT. Um deles apresentava na superfície natural áreas multifocais esbranquiçadas, com diâmetro entre 1 e 3 mm, que se aprofundavam no parênquima ao corte (Figura 4). O outro rim apresentava-se intensamente congesto.

**Figura 4:** Rim de ovino sororeagente para *Leptospira* sp. **A.** Superfície natural com áreas múltifocais brancacentas variando de 1 a 3 mm de diâmetro (setas). **B.** Corte sagital do parênquima renal mostrando as áreas esbranquiçadas observadas na superfície natural (setas).

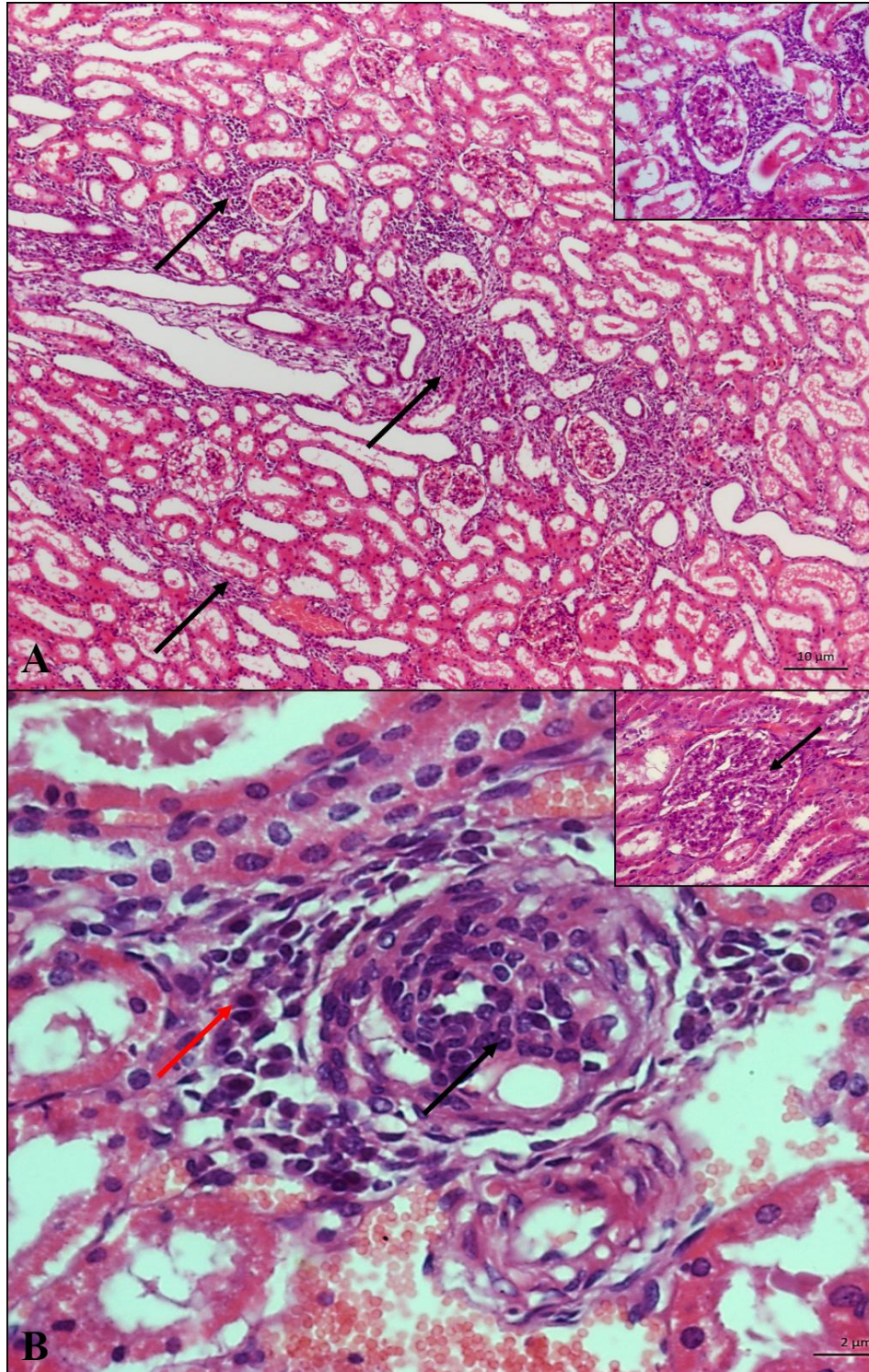


A microscópia revelou discreto a moderado infiltrado inflamatório multifocal linfoplasmocitário, com predomínio de linfócitos, e maior concentração na região córtico-medular (Figura 5). Este foi o principal achado em animais sororeagentes 33,33% (16/48). Com menor frequência verificou-se nos rins: degeneração hidrópica multifocal [10,41% (5/48)] e necrose tubular focal em [4,16% (2/48)] discretas.

Ao se comparar alterações histopatológicas encontradas nos rins de animais sororeagentes e em soronegativos no MAT, a análise estatística demonstrou associação positiva entre Degeneração hidrópica (OR 4,12) inflamação, representada por infiltrado linfoplasmocitário (OR 3,21), Fibrose (OR 3,19) em rins de animais sororeagentes (Tabela 2). Ressalta-se que a inflamação foi o achado mais comum nos rins que tiveram a infecção confirmada por PCR e IHQ (Tabela 3).



**Figura 5** - Fotomicrografia de parênquima renal de ovino HE. **A.** Nefrite intersticial (moderada) em região corticomedular (setas); HE (magnificação de 50x). **Detalhe.** Infiltrado inflamatório mononuclear intersticial HE (magnificação de 400x). **B.** Infiltrado linfoplasmocitário (seta vermelha – plasmócito; seta preta – linfócito). **Detalhe.** Glomerulonefrite proliferativa (seta preta); HE (magnificação de 400x).



**Tabela 2.** Frequência de alterações histopatológicas e associação entre sororeatividade e presença de alterações em animais sororeagentes para *Leptospira* sp.

<b>Tipo de lesão renal</b>	<b>MAT (+)</b>	<b>MAT (-)</b>	<b>OR (IC)</b>
Inflamação	33,33%(16/48)	15,06 % (22/146)	<b>3,21 (1,52 – 6,77)</b>
Degeneração hidrópica	10,41% (5/48)	4,10 % (6/146)	<b>4,12 (1,31 – 12,95)</b>
Necrose	4,16% (2/48)	0% (0/146)	ND
Ectasia tubular	0% (0/48)	0,68% (1/146)	ND
Congestão	18,75% (9/48)	12,32 % (18/146)	1,75 (0,72 – 4,20)
Hemorragia	2,08 % (1/48)	2,73% (4/146)	0,78 (0,08 – 7,16)
Regeneração	4,16% (2/48)	0% (0/146)	ND
Fibrose	2,08 % (1/48)	0,68% (1/146)	<b>3,19 (0,19 – 52,02)</b>
Cilindro hialino	6,25% (3/48)	0% (0/146)	ND

ND = não definido

**Tabela 3.** Descrição dos resultados do MAT, IHQ e achados histopatológicos em rins de ovinos positivos na PCR para leptospiros patogênicas

<b>Animal</b>	<b>MAT</b>	<b>IHQ</b>	<b>Alterações Histopatológicas</b>
RO 63	Bratilslava (100)	Positivo	Infiltrado inflamatório linfocítico multifocal discreto, degeneração hidrópica multifocal e congestão leve multifocal
RO 70	Hardjo (100)	Positivo	Infiltrado inflamatório linfocítico e congestão multifocal discreta
RO 78	Pomona (100)	Positivo	Infiltrado inflamatório, multifocal, discreto, degeneração hidrópica multifocal discreta e congestão multifocal discreta
RO 161	Negativo	Positivo	Infiltrado inflamatório linfocítico moderado, glomerulonefrite proliferativa focal e perivasculite focal leve
RO 162	Negativo	Positivo	Infiltrado inflamatório, multifocal a coalescente, e acentuado, ectasia tubular multifocal leve e congestão multifocal discreta
RO 164	Negativo	Negativo	Infiltrado inflamatório linfocítico focalmente extenso, leve e degeneração hidrópica multifocal discreta
RO 165	Negativo	Negativo	Infiltrado inflamatório linfocítico multifocal discreto e degeneração hidrópica multifocal discreta
RO 171	Negativo	Negativo	Infiltrado inflamatório linfocítico, multifocal discreto, degeneração hidrópica multifocal leve, necrose focal e congestão multifocal discreta

## DISCUSSÃO

Este estudo objetivou investigar a infecção por *Leptospira* sp em ovinos assintomáticos abatidos em matadouro-frigorífico. Todos os animais positivos na PCR apresentaram título igual ou menor que 100 (ponto de corte), com alterações histopatológicas (HE) compatíveis com o quadro de leptospirose crônica e com imunomarcagem positiva para a maioria das amostras.

Títulos de 100 foram os mais frequentes nas reações observadas. A presença de títulos baixos pode ser atribuída a infecções crônicas (CARVALHO et al., 2011), principalmente quando determinadas por sorovares adaptados como Hardjo, que resultam em doença subclínica ou assintomática (ELLIS, 2015). O sorogrupo Serjoe (sv Hardjo) foi predominante nas amostras sororeativas, fato este já documentado em ruminantes por outros autores no mundo e em outros estados brasileiros em geral (SLABERRY et al., 2010; GENOVEZ et al., 2011; CORTIZZO et al., 2014). Segundo Monahan e colaboradores (2009) durante a colonização renal persistente, a formação de biofilme poderia favorecer a evasão, com baixa sinalização para o sistema imune resultando em baixos títulos de anticorpos.

A transmissão da leptospirose requer a circulação enzoótica contínua do patógeno entre os reservatórios animais (AGUDELO-FLOREZ et al., 2013). Neste estudo, cinco dos animais positivos na PCR de rim não apresentaram sororeatividade na MAT o que reitera que a utilização da PCR de detectar carreadores, que muitas vezes não demonstram quaisquer sinais clínicos de doença e apresentam baixos títulos de anticorpos (LILENBAUM et al., 2008a). Segundo Otaka e colaboradores (2012) o teste de aglutinação microscópica (MAT) é uma boa ferramenta para triagem em rebanhos, no entanto, não a consideram preditora de carreadores uma vez que 50% dos bovinos que não reagentes no MAT eliminam leptospiras na urina. Em ambientes onde a enfermidade é endêmica, a ocorrência de animais assintomáticos é comum, sendo estes indivíduos os mais importantes do ponto de vista epidemiológico uma vez que não são identificados e atuam como transmissores para outros animais.

Por meio da PCR, foi possível a detecção de DNA de leptospiras patogênicas em amostras de rins de ovinos assintomáticos, caracterizando-os como carreadores, fato este que corrobora com os achados de Barbante e colaboradores (2014) que demonstraram pela mesma técnica molecular, positividade em 12% (12/100) das amostras de rim e fígado de ovinos naturalmente infectados. Adicionalmente, Director e colaboradores (2014) detectaram DNA



de leptospiros em 38.9% (7/18) das amostras de urina de ovelhas. A PCR-lipL32 tem sido amplamente aplicada para identificar animais portadores, os quais são considerados fonte de propagação da doença nos rebanhos (MAYER-SCHOLL et al., 2011; MARTINS et al., 2013).

Em relação à PCR nas amostras de urina, segundo LUCCHESI et al. (2004), a Taq DNA polimerase pode ser inibida por vários fatores tais como a quelatação de íons de magnésio livres, presença de hemoglobina, sais biliares, polissacarídeos ácidos a partir de glicoproteínas e variações de pH extremas. No presente estudo, imediatamente após a obtenção da urina, foi adicionado PBS objetivando tamponar o pH da amostra e assim manter a integridade das possíveis leptospiros presentes (LUCCHESI et al. 2004; HAMOND et al., 2014). No entanto, o tempo decorrido entre a obtenção das amostras e o processamento molecular variou de três meses a dois anos, sendo estas armazenadas em freezer a -20 °C. Adicionalmente, o método de colheita por cistocentese não impediu a presença de muco na maior parte das urinas testadas e se deve à contração dos músculos uretrais durante o abate, com posterior liberação do sêmen e plasma seminal. Tal fato pode ter prejudicado o processo de extração de DNA nas amostras (HAMOND et al., 2014).

Apesar da não obtenção de estirpes autóctones de leptospiros, a PCR objetivando a amplificação do gene lipL32 detectou DNA de leptospiros patogênicas em amostras de rim, o que confirma o estado de portador renal. Existem poucos relatos de isolamento de leptospiros a partir de ovinos no Brasil (AZEVEDO et al., 2004, SILVA et al., 2007, DA SILVA et al., 2012, DIRECTOR et al., 2014). A cultura de leptospiros é reconhecidamente difícil, demorada e dispendiosa (SILVA et al., 2007). Além disso, o cultivo apresenta baixa sensibilidade, devido às dificuldades inerentes a técnica, incluindo o crescimento fastidioso do organismo em meio artificial, a contaminação e a eliminação intermitente das bactérias pelos hospedeiros (PICARDEAU et al., 2013; LILENBAUM et al., 2008).

Alterações macroscópicas caracterizadas por pontos ou áreas focais esbranquiçadas nos rins de bovinos podem resultar da infecção por leptospiros (AZIZI et al., 2012). Dentre as alterações observadas no presente estudo, nota-se a ocorrência de lesões do tipo white-spot no rim de um animal sororeagente, negativo à PCR, porém com infiltrado inflamatório linfocitário moderado. Dorjee e colaboradores (2009) associa a presença de pontos brancos (white-spot) ao status sorológico em ovelhas, com forte relação entre o título sorológico e a quantidade de pontos brancos nos rins. Em um estudo similar, pontos brancos superficiais, correspondentes a áreas de nefrite intersticial foram identificados durante a inspeção em 24

rins de bovinos abatidos em matadouro frigorífico, e destes 19 apresentaram positividade na PCR, com amplificação do gene lipL32 (AZIZI et al., 2012).

As alterações histológicas descritas no presente estudo são semelhantes às encontradas por Carvalho e colaboradores (2011) em ovinos e por Torres-Castro e colaboradores (2012) roedores, em relação à evidenciação de nefrite intersticial. Na leptospirose, o infiltrado inflamatório é uma alteração primária durante a lesão renal aguda e pode ser causada por danos diretos das leptospirosas ao tecido do hospedeiro ou pela presença de antígeno leptospiral, iniciando uma resposta imune renal (AGUDELO-FLÓREZ et al., 2013; MONAHAN et al., 2009; YANG et al., 2007).

Com a progressão da infecção, as alterações renais podem variar, particularmente entre os hospedeiros de manutenção assintomáticos, em comparação com hospedeiros incidentais sintomáticos. Apesar do rim ser o órgão de predileção para a localização de leptospirosas, a patogenia das alterações renais ainda é pouco conhecida nos animais e principalmente em ovinos (CARVALHO et al., 2011). No presente estudo, a inflamação nos animais positivos na PCR foi caracterizada como crônica uma vez que o infiltrado inflamatório era composto predominantemente por linfócitos, poucos plasmócitos e com ausência de fibrose (CARVALHO et al., 2011).

No presente estudo, foram visualizadas imunomarcações aderidas às células epiteliais tubulares em vários campos microscópicos na região cortico-medular, o que corrobora com os achados de Carvalho e colaboradores (2011), que também relataram a presença de leptospirosas em túbulos renais, por IHQ, utilizando anticorpo anti-Leptospira (1:400) em ovinos naturalmente infectados. Adicionalmente, Saglam e colaboradores (2008) demonstraram antígeno de Leptospira sorovar Hardjo no epitélio luminal de células tubulares e no citoplasma das células epiteliais da pelve renal de fetos ovinos. Vale destacar que o anticorpo utilizado neste estudo foi anti-LipL32, que é a lipoproteína mais abundante em leptospirosas patogênicas (PICARDEAU, 2017).

Mesmo se tratando de uma marcação específica para leptospirosas em tecidos, ressaltamos que há maior dificuldade em detectar o antígeno por IHQ em rins de ovinos quando comparados com a aplicação da mesma técnica em rins de ratos. Nestes, devido ao tamanho reduzido do órgão é possível confeccionar lâminas com secções histológicas, que abrangem toda a região cortical em um corte transversal, sendo representativa do órgão como um todo. Por outro lado, em ovinos, as secções correspondem a uma pequena área (1 cm<sup>3</sup>) em um dos pólos do órgão, o que pode requerer confecção e análise de mais de uma secção de

parênquima, oriundas de áreas diferentes do órgão, para a realização do diagnóstico, e desta forma, apesar da imunomarcção positiva na IHQ, não foi observada co-localização nos cortes histológicos sequenciais corados com AA e PAS, correspondentes às mesmas áreas. Conseqüentemente, não foi possível confirmar a presença de biofilme leptospírico. Destaca-se que os animais avaliados foram abatidos com idades variando entre seis meses e um ano, o que nos permite assumir que, potencialmente, foram expostos ao agente por um curto período de tempo, resultando em uma colonização menos intensa e a não identificação de biofilme no momento. No estudo conduzido por Santos e colaboradores (2015), foi observado que ratos adultos têm três vezes mais risco de adquirir infecção do que ratos jovens. Entretanto, não há relato de estudo semelhante em ovinos.

Adicionalmente, a distribuição da colonização renal em ratos, naturalmente infectados, se mostrou heterogênea (SANTOS et al., 2015). Neste estudo, em relação à distribuição dos túbulos renais marcados na IHQ, observou-se que um dos animais apresentou colonização renal generalizada com túbulos marcados em todo o córtex e quatro apresentaram um ou mais túbulos marcados por campo, em aglomerados, e em diferentes regiões do córtex.

## CONCLUSÃO

Concluimos que os ovinos detectados como carreadores de leptospiros apresentaram um padrão de lesão renal compatível com infecção crônica caracterizada pela presença de infiltrado inflamatório linfoplasmocitário, que variou de discreto a moderado. Apesar da evidência de baixo título de anticorpos e imunomarcagem específica com anticorpo anti-LipL32, não se pôde confirmar presença de biofilme leptospírico.

## REFERÊNCIAS

- ADLER, B., DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v.140, n.3-4, p.287-296, 2010.
- AGUDELO-FLÓREZ, P., MURILLO, V.E., LONDOÑO, A.F., RODAS, J.D.. Histopathological kidney alterations in rats naturally infected with *Leptospira*. **Biomedica**, 33(Suppl 1): 82-88. 2013
- AGUIAR, D.M., CAVALCANTE, G.T., VASCONCELLOS, S.A., SOUZA, G.O., LABRUNA, M.B., CAMARGO, L.M.A., GENNARI, S.M. Anticorpos anti-*Leptospira* spp. em ovinos domunicípio de monte negro, estado de Rondônia. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, n.3, p.529-532, 2010.
- AJAYI, O. L., ANTIA, R. E., OJO, O. E., AWOYOMI, O. J., OYINLOLA, L. A, OJEBIYI, O. G. Prevalence and renal pathology of pathogenic *Leptospira* spp. in wildlife in Abeokuta, Ogun State, Nigeria. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 84, n.1, 2017.
- ALENCAR, S. P. A., MOTA, R. A., COELHO, M. C. O. C., NASCIMENTO, S. A., ABREU, S. R. O., CASTRO, R. S. Perfil sanitário dos rebanhos caprinos e ovinos no Sertão de pernambuco, **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n. 1, p. 131-140, 2010.
- ALVES, C.J., ALCINDO, J.F., FARIAS A.E.M., HIGINO, S.S.S., SANTOS, F.A., AZEVEDO, S.S., COSTA, D.F., SANTOS, C.S.A.B. Caracterização epidemiológica e fatores de risco associados à leptospirose em ovinos deslanados do semiárido brasileiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, p.523-528 2012.
- ALVES, L. G. C., OSÓRIO, J. C. S., FERNANDES, A. R. M., RICARDO, H. A., CUNHA, C. M. In: **Enciclopédia Biosfera**, v.10, n. 18, p. 2399, 2014.
- AMORIM, R. M., NASCIMENTO, E. M., SANTAROSA, B. P. DANTAS, G. N., FERREIRA, D. O. L., GONÇALVES, C. RULLMANN, L. S., LANGONI, H.

soroprevalência da leptospirose em ovinos da região Centro-Oeste do estado de São Paulo. **Veterinária e Zootecnia**, v.23, n.2, 297-305, 2016.

ARENT, C., FRIZZELL, C., GILMORE, MACKIE, D., ELLIS, W. A. Isolation of Leptospire from genital tract of sheep. **Veterinary Record**, v. 173, n, 23, 2013.

ATHANAZIO, D. A., E. F. SILVA. *Rattus norvegicus* as a model for persistent renal colonization by pathogenic *Leptospira interrogans*. **Acta Tropica**. v. 105, n. 2, p. 176-180. 2008.

AZEVEDO, S. S., ALVES, C. J., ANDRADE, J. S. L., SANTOS, J. A., FREITAS, T. D., BATISTA, C. S. A. Isolation of *Leptospira* spp. from kidneys of sheep at slaughter. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 71, p. 383-385, 2004a.

AZEVEDO, S.S., ALVES, C.J., ANDRADE, J.S.L., BATISTA,C.S., CLEMENTINO, I.J., SANTOS, F.A. Ocorrência de aglutininas anti- *Leptospira* em ovinos de estado de Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.11, n.3, p.167-170, 2004b.

AZIZI, S., KHEIRANDUSH, R., RAHIMI, E. Comparison of polymerase chain reaction and Warthin- Starry techniques to detect *Leptospira* spp. in kidneys of slaughtered cattle. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**. v. 81, p. 1-6, 2014.

BARBANTE, P., SHIMABUKURO, F. H., LANGONI, H., RICHINI-PEREIRA, V. B., & LUCHEIS, S. B. *Leptospira* spp. infection in sheep herds in southeast Brazil. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v20, p.394-405. 2014.

BREINER, D. D., FAHEY, M., SALVADOR, R., NOVAKOVA, J., COBURN, J. *Leptospira interrogans* binds to human cell surface receptors including proteoglycans. **Infection and Immunity**, v. 77, p. 5528-5536, 2009.

BRIHUEGA, B. SAMARTINO, L., AUTERI, C., VENZANO, A., CAIMI. t al. In vivo cell aggregations of a recent swine biofilm-forming isolate of *Leptospira interrogans* strain from

Argentina. **Revista Argentina Microbiologia**, v. 44, n. 3, p. 138–143, 2012.

BULACH, D. M., ZUERNER, R. L., WILSON, P., SEEMAN, T., MCGRATH, A., CULLEN, P. A., DAVIS, J., JOHNSON, M., KUCZEK, E., ALT, D. P. PETERSON-BURCH, B., COPPEL, R. L., ROOD, J. I., DAVIS, J. K. & ADLER, B. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, p. 14560–14565, 2006.

CALDERON, A., RODRIGUEZ, V., MATTAR, S., ARRIETA, G. Leptospirosis in pigs, dogs, rodents, humans, and water in an area of the Colombian tropics. **Tropical Animal Health and Production** v. 46, p. 427–432, 2014.

CAMERON, C. E. Leptospiral Structure, Physiology, and Metabolism. In ADLER, B (Ed). **Leptospira and Leptospirosis**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2015. p. 21-41.

CAMPOS, A. P., MIRANDA, D. F., RODRIGUES H.W.S., LUSTOSA, M. S. C., MARTINS, G. MINEIRO, L. B. B., CASTRO, V., AZEVEDO, S. S., SILVA, S. M. M. Seroprevalence and risk factors for leptospirosis in cattle, sheep, and goats at consorted rearing from the State of Piauí, northeastern Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 49, 2017.

CARNEIRO, L. A., BAHIA, M. N. M., PEREIRA, W. L. A., DIAS, H L. T., COSTA, A.R. F. Investigação sorológica, molecular e anatomopatológica para leptospirose em ovinos (*Ovis aries*) procedentes de um biotério de cria o. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**,v. 6 n. 4, 2015.

CARVALHO, S. M., GONÇALVES, L. M. F., MACEDO, N. A., GOTO, H., SILVA, S. M. M. S., MINEIRO, A. L. B. B., KANASHIRO, E. H. Y., COSTA, F. A. L. Infec o por leptospiras em ovinos e caracteriza o da resposta inflamatória renal. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 8, p. 637-642, 2011.

CARVALHO, S.M., MINEIRO, A.L.B.B., CASTRO, V., GENOVEZ, M. E., AZEVEDO, S.S., COSTA, F.A.L. Leptospirosis seroprevalence and risk factors for sheep in Maranhão state, Brazil. **Tropical Animal Health and Production** v. 46 p. 491–494, 2014.

CERQUEIRA, G. M., PICARDEAU, M. A. A century of leptospira strain typing. **Infection, Genetics and Evolution**. v. 9, p. 760-768, 2009.

CHAEMCHUEN, S., RUNGPRAGAYPHAN S., POOVORAWAN, P., PATARAKU, K. Identification of candidate host proteins that interact with LipL32, the major outer membrane protein of pathogenic *Leptospira*, by random phage display peptide library. **Veterinary Microbiology**, v. 153, n. 1, p. 178–185, 2011.

CHANG, M., CHENG, Y., HSU, S., MA, T., CHOU, L., HSU, H., TIAN, Y., CHEN, Y., SUN, Y, HUNG, C., PAN, R., YANG. Leptospiral Outer Membrane Protein LipL32 Induces Inflammation and Kidney Injury in Zebrafish Larvae. **Scientific Reports** v. 6. 2016.

CORTIZO P., LOUREIRO A. P., MARTINS, G., RODRIGUES, P. R., FARIA, B. P., LILENBAUM, W., DEMINICIS, B. B. Risk factors to incidental leptospirosis and its role on the reproduction of ewes and goats of Espírito Santo state, Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 47, n. 1, p. 231-235, 2014.

COSTA, D F., SILVA, A. F., BRASIL, A. W. L., LOUREIRO, A. P. P., , SANTOS, F. A., AZEVEDO, S. S., LILENBAUM, W., ALVES, C. J. Leptospirosis in native mixed-breed sheep slaughtered in a semiarid region of Brazil. **Ciência Rural**, v.47, n. 2, p. 2017.

COSTA, F., HAGAN, J. E., CALCAGNO, J., KANE, M., TORGERSON,P., MARTINEZ-SILVEIRA, M. S., STEIN, C., BERNADETTE ABELA-RIDDER, B., KO, A. I. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. 1 – 19, 2015.

COSTA. D. F, SILVA. A, F., FARIAS. A, E, BRASIL. A, L, SANTOS. F, A, GUILHERME. R, F, AZEVEDO. S, S., ALVES. C, J. Serological study of the infection by *Leptospira* spp. in sheep and goats slaughtered in the State of Paraíba, semiarid of Northeastern Brazil. **Semina:**



**Ciências Agrárias**, v. 37, n. 2, p. 819-828, 2016.

CRODA, J., FIGUEIRA, C.P, WUNDER JR, E. A., SANTOS, C. S., REIS, M.G., KO, A. I., PICARDEAU, M. Targeted mutagenesis in pathogenic *Leptospira* species: disruption of the LigB gene does not affect virulence in animal models of leptospirosis. **Infection and Immunity**. v. 76, n. 12, p. 5826-5833, 2008.

DAHER, E. F., ABREU, K. L. S., SILVA JUNIOR, G. B. Leptospirosis-associated acute kidney injury. **Journal of Brazilian Nephrology**. v.4, n.43, p.400-407, 2010.

DE FARIA, M. T., CALDERWOOD, M. S., ATHANAZIO, D. A., MCBRIDE, A. J., HARTSKEERL, R. A., PEREIRA, M. M., KO, A. I., REIS, M. G. Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. **ActaTropica**, v. 108, p. 1-5, 2008.

DE OLIVEIRA D., FIGUEIRA C. P., ZHAN L., PERTILE A. C., PEDRA G. G., GUSMÃO I. M., WUNDER JR E. A., RODRIGUES G., RAMOS E. A. G., KO A. I., CHILDS J. E., REIS M. G. & COSTA F. 2016. *Leptospira* in breast tissue and milk of urban Norway rats (*Rattus norvegicus*). **Epidemiology and Infection**, v.144, n.1, p.:2420-2429. 2016.

DIRECTOR, A, PENNA,B. HARMOND,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.

DORJEE, S., HEUER, C., JACKSON, R., WEST, D. M., COLLINS-EMERSON, J. M., MIDWINTER, A. C., RIDLER, A. L. Prevalence of pathogenic *Leptospira* spp. in sheep in a sheep-only abattoir in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 56, p. 164-170, 2008.

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.

DOS SANTOS, J. P., LIMA-RIBEIRO, A. M., OLIVEIRA, P. R., DOS SANTOS, M. P., JÚNIOR A. F., MEDEIROS, A. A., TAVARES, T. C. Seroprevalence and risk factors for Leptospirosis in goats in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, p. 101-106, 2012.

DREYFUS, A., BENSCHOP, J., COLLINS-EMERSON, J., WILSON, P., BAKER, M. G., HEUER, C. Sero-prevalence and risk factors for leptospirosis in abattoir workers in New Zealand. **International Journal of Environmental Research Public Health**. v11, p. 1756–1775. 2014.

ELLIS WA. . Animal Leptospirosis. In ADLER, B (Ed). **Leptospira and Leptospirosis**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2015; 99-138

ESCÓCIO, C., GENOVEZ, M. E., CASTRO, V., PIATTI, R. M., GABRIEL, F. H. L., CHIEBAO, D. P., AZEVEDO, S. S., VIEIRA, S. R., CHIBA, M. Influência das condições ambientais na transmissão da leptospirose entre criações de ovinos e bovinos da região de Sorocaba, SP. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 3, p. 371-379, 2010.

ESMAEILI, S., NADDAF, S. R., POURHOSSEIN, B., SHAHRAKI, A. H., AMIRI, F. B., GOUYA, MO. M., MOSTAFAVI, E. Seroprevalence of Brucellosis, Leptospirosis, and Q Fever among Butchers and Slaughterhouse Workers in South-Eastern Iran. **PLoS ONE** v. 11 n. 1, 2016.

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.

FAOSTAT. *Food and Agriculture Organization of the United Nations: FAOSTAT Database*. FAO Statistical Databases, 2015. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 28 setembro 2016.

FAVERO, A. C. M., PINHEIRO, S. R., VASCONCELLOS, S. A., MORAIS, Z. M., FERREIRA, F., FERREIRA NETO, J. S. Sorovares de leptospiros predominantes em exames sorológicos de bubalinos, ovinos, caprinos, equinos, suínos e cães de diversos estados brasileiros. **Ciência Rural**, v. 32, p. 613-619, 2002.

FLEMMING, H. C., WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Review Microbiology**, v. 8, p.623-633, 2010.

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 Microbiological Methods**, n. 90, n. 3, p. 321-326, 2012.

FOUTS, D. E., MATTHIAS, M. A., ADHIKARLA, H., ADLER, B., AMORIM-SANTOS, L., BERG, D. E., VINETZ, J. M. What Makes a Bacterial Species Pathogenic? Comparative Genomic Analysis of the Genus *Leptospira*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.10 n. 2, 2016.

GENOVEZ, M.E.; ESCÓCIO, C.; CASTRO, V.; GABRIEL, F.H.L.; CHIEBAO, D.P.; AZEVEDO, S.S.. Fatores de risco associados à infecção pela *Leptospira* spp. Sorovar Hardjo em rebanhos exclusivos de ovinos e nos consorciados com bovinos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.78, n.4, p.587-592, 2011.

GOUVEIA, E. L., METCALFE, J., CARVALHO, A.L.F., AIRES, T.S.F., VILLASBOAS-BISNETO, J.C., QUEIROZ, A., SANTOS, A.C., SALGADO, K., REIS, M.G., KO, A.I. Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. **Emerging Infection Disease**. N. 14, v.3, p. 505-508, 2008.

HAAKE, D. A, LEVETT. P.N. Leptospirosis in Humans. In ADLER, B (Ed). **Leptospira and Leptospirosis**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. p. 65-97. 2015.

HAAKE, D. A., MATSUNAGA, J. *Leptospira*: a spirochaete with a hybrid outer membrane. **Molecular Microbiology**, v.77, p. 805-814, 2010.

HAMOND, C; MARTINS, G.; LOUREIRO, A.P.; PESTANA, C.; LAWSON-FERREIRA, R.; 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.

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.

HAUK, P., MACEDO, F., ROMERO, E. C., VASCONCELLOS, S.A., DE MORAIS, Z. M., BARBOSA, A. S., HO, P. L. LipL32, the major leptospiral lipoprotein, the C terminus is the primary immunogenic domain and mediates interaction with collagen IV and plasma fibronectin. **Infection and Immunity**. v. 76, p. 2642–2650, 2008.

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 Mesoregiões Sudeste e Sudoeste do Estado Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 34, p. 443-448, 2004.

HIGINO, S.S.S., AZEVEDO, S.S., ALVES, C.J., FIGUEIREDO, S.M., SILVA, M.L.C.R., BATISTA, C.S.A. Frequência de leptospirose em ovinos abatidos no município de Patos, Paraíba. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, n.3, p.525-527, 2010.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estatística da Produção Pecuária. Disponível em:<<http://www.ibge.gov.br>>: Acesso em 15 fevereiro de 2017. 2014.

KO, A.I., GOARANT, C., PICARDEAU, M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature**, v. 7, p. 736-747, 2009.

KUMAR, K. V., LALL, C., RAJ, R., VEDHAGIRI, K. , VIJAYACHARI, P.. Molecular detection of pathogenic leptospiral protein encoding gene (lipL32) in environmental aquatic biofilms. **Lett Appl Microbiol**, 2015a.

KUMAR, K. V., LALL, C., RAJ, R., VEDHAGIRI, K. , VIJAYACHARI, P. Co-existence and survival of pathogenic leptospires by formation of biofilm with *Azospirillum*. **FEMS Microbiology Ecology**, p. 1–27, 2015b.

LAMEIRE, N. H, BAGGA A., CRUZ, D., DE MAESENEER, J., ENDRE, Z . Acute kidney injury: an increasing global concern. **Lancet**. 2013, 382: 170–179.

LEHMANN, J. S, MATTHIAS, M. A, VINETZ, J. M, FOUTS, D. E. Leptospiral pathogenomics. **Pathogens**. V. 3, n. 2. p.280–308. 2014.

LEVETT, P.N. Systematics of Leptospiraceae. In ADLER, B (Ed). **Leptospira and Leptospirosis**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2015. p. 11-20.

LILENBAUM, W., VARGES, R., BRANDÃO, F. Z., CORTEZ, A., DE SOUZA, S. O., BRANDÃO, P. E., RICHTZENHAIN, L. J., VASCONCELLOS, S. A. Detection of *Leptospira* spp. in semen and vaginal fluids of goats and sheep by polymerase chain reaction. **Theriogenology**, v. 69, p. 837-842, 2008.

LILENBAUM, W., VARGES, R., RISTOW, P., CORTEZ, A., SOUZA, S. O., RICHTZENHAIN, L. J., VASCONCELLOS, S. A. Identification of *Leptospira* spp. carriers among seroreactive goats and sheep by polymerase chain reaction. **Research in Veterinary Science**, v. 87, p. 16-19, 2009.

LPSN, List of prokaryotic names with standing nomenclature. Disponível em: <http://www.bacterio.net/leptospira.html>, Acesso em 16 março de 2017.

LUCCHESI, P.M.A.; ARROYO, G.H.; ETCHEVERRÍA, A.I.; PARMA, A.E.; SEIJO, A.C. Recommendations for the detection of *Leptospira* in urine by PCR. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n.2, p.131-134. 2004.

MARINHO, M., MENDES, L.C.N., NORIYUKI KANETO, C.N., VIDOVIX TAPARO, C.V.BERNARDES, J.O.R., LOMBARDI, A.L., VENTUROLI PERRI,S.H.V., BALDASSO,A.B., RIBEIRO,M.M. Perfil de aglutininas anti-leptospira e anti-brucella e condições sanitárias de ovinos da região noroeste do estado de São Paulo, Brasil. **Veterinária e Zootecnia**, v.19, p.593-600, dez/. 2012.

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

MARTINS, G., PENNA, B., LILENBAUM, W. Differences between seroreactivity to leptospirosis in dairy and beef cattle from the same herd in Rio de Janeiro, Brazil. *Tropical Animal Health and production*, v. 44, p.377–378. 2012.

MAYER-SCHOLL, A, DRAEGER, A, LUGE, E.NNO,ULRICH,R,NO CKLER,K. Comparison of Two PCR Systems for the Rapid Detection of *Leptospira* spp. from Kidney Tissue. **Current Microbiology**, V.62, P.1104-1106, 2011.

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

MORAIS, C. C. G., GUERREIRO, A. N., KURODA, R. B. S., SOUZA, V. A. F., MENESES, A. M. C., VASCONCELLOS, S. A. Inquérito sorológico para leptospirose em rebanhos de ovinos no município de Igarapé- Açu, Estado do Pará. **Revista de Ciências Agrárias**, v.55, n.1, p.58-60, jan/mar. 2012.

MURRAY, G. L. The lipoprotein LipL32, An enigma of leptospiral biology. **Veterinary Microbiology**, v. 162, n. 2-4, p. 305–314, 2013.

MURRAY, G.L. The Molecular Basis of Leptospiral Pathogenesis In ADLER, B (Ed). **Leptospira and Leptospirosis**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p. 139-185.

2015.

MUSSO, D., LASCOLA, B. Diagnostic biologique de la leptospirose. **Revue Francophone des Laboratoires**, França, n. 449, p.39-46, 2013.

MWACHUI, M. A., LISA CRUMP, L., HARTSKEERL, H., JAKOB ZINSSTAG, J., HATTENDORF, J. Environmental and Behavioural Determinants of Leptospirosis Transmission: A Systematic Review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. 1–15, set. 2015.

NALLY JE, WHITELEGGE JP, BASSILIAN S, BLANCO DR, LOVETT MA Characterization of the outer membrane proteome of *Leptospira interrogans* expressed during acute lethal infection. **Infection and Immunity** 75: 766–773, 2007.

OIE. **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**. World Organization for Animal Health, Paris, 2014. Disponível em:[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 maio de 2017.

OTAKA, D, PENNA, B., MARTINS, G., LILENBAUM, W. Serology and PCR for bovine leptospirosis: a herd and individual approaches. **The Veterinary Record**, 170, p.338, 2012.

PARSEK, M. R., SINGH, P. K. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. **Annual Review of Microbiology**, v. 57, p. 677-701, 2003.

PICARDEAU, M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. **Médecine et maladies infectieuses**, v. 43, p. 1–9, jan. 2013.

PINNE, M., A. HAAKE, A.. LipL32 Is a Subsurface Lipoprotein of *Leptospira interrogans*: Presentation of New Data and Reevaluation of Previous Studies. **PLoS ONE** v. 8 n.1, 2013.

PUGH, D. G., BAIRD, A. N. **Sheep and goat medicine**. 2nd ed. Maryland Heights: Elsevier, 2011. 640 p.

REINA, R., BERRIATUA, E., LUJÁN, L., JUSTE, R., SÁNCHEZ, A., DE ANDRÉS, D., AMORENA, B. Prevention strategies against small ruminant lentiviruses: an update. **The Veterinary Journal**, v. 182, p. 31-37, 2009.

RISTOW, P., BOURHY, P., KERNEIS, S., SCHMITT, C., PREVOST, M. C., LILENBAUM, W., PICARDEAU, M. Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. **Microbiology**, v. 154, p. 1309-1317, 2008.

RISTOW, P., BOURHY, P., MCBRIDE F.W.C., FIGUEIRA, C.P., HUERRE, M., AVE, P., SAINT GIRONS, I.S., KO, A.I., PICARDEAU, M. The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. **PLoS Pathogens**, v.3, p. 894-903, 2007.

RIZZO, H., GREGORY, L., BERARDI, F., CASTRO, V., MORAES, Z.M., VASCONCELLOS, S.A. Análise de fator de risco e avaliação clínica de ovinos com histórico de distúrbios reprodutivos infectados por *Leptospiras* pertencentes a criatórios do estado de São Paulo. **Veterinária. e Zootecnia**, v.18, dez. 2011.

ROSSETTI C. A., BOGGIA, V. Evaluation of polymerase chain reaction assay for pathogenic *Leptospira* detection in stored urine. *Microbiology Research*; v. 5:5427, 2014.

ROSA A. H., SEIXAS, L. S., PIMENTEL C. M. M., LEITE, R. c. , MOREIRA, E. C., M. Mastite e síndrome da queda do leite / infecção por *Leptospira interrogans* em ovelhas da raça Santa Inês no Distrito Federal. **Ciência Animal Brasileira**. v.13, n.2, p. 240-246, 2012.

SAGLAM Y. S., YENER Z., TEMUR A. & YALCIN E. Immunohistochemical detection of leptospiral antigens in cases of naturally occurring abortions in sheep. **Small Ruminants Research**. . 74, p.119-122, 2008.

SALABERRY, S. R. S., CASTRO, V., NASSAR, A. F. C., CASTRO, J. R., GUIMARÃES, E. C., & LIMA-RIBEIRO, A. M. C. Seroprevalence and risk factors of antibodies against *Leptospira* spp. in ovines from Uberlândia municipality, Minas Gerais state, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42 .n. 4, p. 1427–1433, 2011.



SANTOS, A. A. N. FIGUEIRA, C. P., REIS, M. G., COSTA, F., RISTOW, P. Heterogenic colonization patterns by *Leptospira interrogans* in *Rattus norvegicus* from urban slums. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 1161–1164, dez. 2015.

SARMENTO, A. M. C., AZEVEDO, S. S., MORAIS, Z.M., SOUZA, G. O., OLIVEIRA, F. C. S., GONÇALES, A. P., MIRAGLIA, F., VASCONCELLOS, S. A.. Use of *Leptospira* spp. strains isolated in Brazil in the microscopic agglutination test applied to diagnosis of leptospirosis in cattle herds in eight Brazilian states. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n.7, 601-606, 2012.

SEIXAS, L. DE S., DE MELO, C. B., LEITE, R. C., MOREIRA, E. C., MCMANUS, C. M., DE CASTRO, M. B. Anti-*Leptospira* sp. agglutinins in ewes in the Federal District, Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 43, p. 9-11, 2011.

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, p.133-149, 2007.

SILVA, G. C. P. **Caracterização epidemiológica de brucelose e leptospirose de pequenos ruminantes dos estados de Sergipe, Bahia, Ceará e Paraíba** (2015) 112 p.

SIMPLÍCIO, A. A. Caprinocultura e Ovinocultura de corte no Brasil: pontos para reflexão. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, ano 17, n. 52, p. 27-36, 2011.

SMYTHE, L., ADLER, B., HARTSKEERL, R. A., GALLOWAY, R. L., TURENNE, C. Y., LEVETT, P. N. Classification of *Leptospira* genomospecies 1, 3, 4 and 5 as *Leptospira alstonii* sp. nov., *Leptospira vanthielii* sp. nov., *Leptospira terpstrae* sp. nov. and *Leptospira yanagawae* sp. nov., respectively. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. Pt 5, p. 1859–1862, 2013.

STODDARD, R. A.; GEE, J. E.; WILKINS, P. P.; MCCAUSTLAND, K.; HOFFMASTER, A. R. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 64, p. 247-

255, 2009.

SUEPAUL, S. M.; CARRINGTON, C. V.; CAMPBELL, M.; BORDE, G.; ADESIYUN, A. A. Seroepidemiology of leptospirosis in dogs and rats in. **Tropical Biomedicine**, v. 31, n. 4, p. 853–861, 2014.

SYKES, J.E., HARTMANN, K., LUNN, K.F., MOORE, G.E., STODDARD, R.A., GOLDSTEIN, R.E. ACVIM Small Animal Consensus Statement on Leptospirosis: Diagnosis, Epidemiology, Treatment, and Prevention. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 25, p.1-13, 2011.

TOYOKAWA, T., OHNINSHI, M., KOIZUMI, N. Diagnosis of acute leptospirosis. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 9, n. 1, p. 111–121, 2011.

TRABULSI, L. R., ALTERTHUM, F. MICROBIOLOGIA. In: ALTERTHUM, Flavio: Crescimento Bacteriano. 6ª ed. São Paulo: **Editora Atheneu**, 2015. cap. 4 pg. 31

TRUEBA, G., S. ZAPATA, ET AL. (2004). "Cell aggregation: a mechanism of Pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. **Int Microbiol**, v. 7, n. 1, p. 35-40.

YANG, C.W. Leptospirosis renal disease: understanding the initiation by toll-like receptors. **Kidney International**, n.72, v. 8, p. 918-925, 2007.

ZAKERI, S., KHORAMI, N., GANJI, Z.F., SEPAHIAN, N., MALMASI, A., GOUYA, M.M., DJADID, N.D. *Leptospira wolffii*, a potential new pathogenic *Leptospira* species detected in human, sheep and dog. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 2, p. 273-277, 2010.

ZUERNER, R. Laboratory maintenance of pathogenic *Leptospira*. **Current protocols in Microbiology**, v.12, p.1-13, 2005.

## ANEXO 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

**CERTIFICADO**

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia aprovou, na reunião de 02 de agosto de 2013, o parecer referente ao protocolo nº. 21/2013 e certifica que o Projeto de pesquisa intitulado **“Avaliação da colonização renal por leptospiros em ovinos e caprinos reservatórios da leptospirose através de técnicas clássicas e moleculares”**, coordenado pela Prof<sup>a</sup>. Melissa Hanzen Pinna, está de acordo com os princípios de ética e bem estar animal.

Salvador, 05 de agosto de 2013

---

Lúcio Leopoldo de Aragão da Silva  
Coordenador CEUA/MEVZ-UFBA

## ANEXO 2

Relação dos sorovares empregados como antígenos na realização do teste de aglutinação microscópica (MAT), conforme recomendação da OIE (2014).

<b>Espécie</b>	<b>Sorovar</b>	<b>Sorogrupo</b>	<b>Amostra de referência</b>
<i>L. interrogans</i>	Wolffi	Sejroe	3705
<i>L. interrogans</i>	Hardjo	Sejroe	Hardjoprajitno
<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
<i>L. noguchii</i>	Panama	Panama	CZ 214 K
<i>L. noguchii</i>	Lousiana	Lousiana	1945
<i>L. weilli</i>	Coxi	Javanica	Cox
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA
<i>L. interrogans</i>	Djasiman	Djasiman	Djasiman
<i>L. weilli</i>	Celledoni	Celledoni	Celledoni
<i>L. interrogans</i>	Bataviae	Bataviae	Swart
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Duyster
<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Ballum	Mus 127
<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A
<i>L. biflexa</i>	Patoc	Semaranga	Patoc I
<i>L. interrogans</i>	Copenhageni	Icterohaemorrhagiae	M 20
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV
<i>L. interrogans</i>	Copenhageni	Icterohaemorrhagiae	L1 130
<i>L. borgpetersenii</i>	Castellonis	Ballum	Castelon 3
<i>L. borgpetersenii</i>	Javanica	Javanica	Veldrat Batavia 46
<i>L. santarosai</i>	Shermani	Shermani	1342 K
<i>L. borgpetersenii</i>	Tarassovi	Tarassovi	Perepelicin
<i>L. santarosai</i>	Geórgia	Mini	LT117
<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona	Pomona
<i>L. interrogans</i>	Bratislava	Australis	Jez Bratislava
<i>L. interrogans</i>	Hembomadis	Hembomadis	Hembomadis