



Universidade de Brasília
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária
Programa de Pós-graduação em Saúde Animal

**PESQUISA DE *Leptospira* spp. EM RINS DE SUÍNOS ABATIDOS EM
FRIGORÍFICOS DO DISTRITO FEDERAL POR PCR**

MARCELA LOBO TOKATJIAN

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

BRASÍLIA/DF

FEVEREIRO/2016



Universidade de Brasília
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária
Programa de Pós-graduação em Saúde Animal

**PESQUISA DE *Leptospira* spp. EM RINS DE SUÍNOS ABATIDOS EM
FRIGORÍFICOS DO DISTRITO FEDERAL POR PCR**

MARCELA LOBO TOKATJIAN

ORIENTADORA: PROF.^a DR.^a SIMONE PERECMANIS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

PUBLICAÇÃO: 123/2016

BRASÍLIA/DF

FEVEREIRO 2016



Universidade de Brasília
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária
Programa de Pós-graduação em Saúde Animal

PESQUISA DE *Leptospira* spp. EM RINS DE SUÍNOS ABATIDOS EM FRIGORÍFICOS DO DISTRITO FEDERAL POR PCR.

MARCELA LOBO TOKATJIAN

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM SAÚDE ANIMAL

APROVADA POR:

**SIMONE PERECMANIS, PROF.^a DR.^a (Universidade de Brasília)
(ORIENTADORA)**

**ÂNGELA PATRÍCIA SANTANA, PROF.^a DR.^a (Universidade de Brasília)
(EXAMINADORA INTERNA)**

**LIGIA MARIA CANTARINO DA COSTA, PROF.^a DR.^a (Universidade de Brasília)
(EXAMINADORA EXTERNA)**

BRASÍLIA/DF, 25 DE FEVEREIRO DE 2016

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

TOKATJIAN, M. L. **Pesquisa de *Leptospira* spp. em rins de suínos abatidos em frigoríficos do Distrito Federal por PCR.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2016, 72p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Tokatjian, Marcela Lobo

Pesquisa de *Leptospira* spp. em rins de suínos abatidos em frigoríficos do Distrito Federal por PCR / Marcela Lobo Tokatjian / Orientação de Simone Perecmanis – Brasília, 2016. 72p.: il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília / Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2016.

1. Suíno. 2. *Leptospira* 3. Proteína LipL32. 4. PCR.
I. Perecmanis, S. II. Doutora.

CDD ou CDU
Agris / FAO

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família, em especial a minha mãe, Carmen. Um exemplo de mulher batalhadora, sempre me ensinando a seguir em frente e a nunca desistir dos meus sonhos. Como ela gosta de dizer: “os olhos são fracos, mas os braços são fortes!”. Com esse pensamento em mente eu vou vencendo dificuldades e sigo traçando a minha história.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe, Carmen, e a minha irmã, Maria, por praticamente dividirem comigo toda a euforia envolvida na realização dessa dissertação.

Agradeço especialmente a minha orientadora, Simone Perecmanis, por ter acreditado em mim e ter me acolhido desde a época da Residência Médica Veterinária. Reconheço e sou extremamente grata por toda a sua ajuda, paciência e compreensão durante a minha trajetória dentro da Universidade de Brasília.

Agradeço à professora Ângela Patrícia Santana e à professora Lígia Cantarino por terem aceitado participar da minha banca examinadora. Tenho certeza que as contribuições serão extremamente valiosas.

Agradeço imensamente à diretoria do DIPOVA/SEAGRI/DF por permitirem a coleta nos abatedouros fiscalizados e, sobretudo, agradeço às fiscais Cecília e Maíra por me auxiliarem nas coletas das amostras em todos os abatedouros visitados.

Agradeço novamente à professora Ângela Patrícia por autorizar o uso de um equipamento específico em seu Laboratório.

Agradeço aos integrantes da equipe dos Laboratórios de Microbiologia Veterinária e de Patologia Clínica da UnB (residentes, técnicos e mestrados). Gostaria de agradecer especialmente a técnica Marcela Scalon e o mestrando Filipe Carneiro por sempre estarem dispostos a me socorrer durante os procedimentos realizados no Laboratório de Biologia Molecular.

Agradeço às mestradas Luciana Lobo e Elisângela Aline por compartilharem praticamente todas as vivências do mestrado, dos momentos leves aos momentos de maior tensão.

Agradeço a minha grande amiga sino-brasileira, Ying, que mesmo estando do outro lado do mundo, foi capaz de subtrair toda a ansiedade e apreensão consequentes da elaboração de uma dissertação e somar com seu apoio moral, motivação e compreensão.

Enfim, agradeço a todos os envolvidos na realização deste trabalho. Gostaria de dividir a minha emoção e alegria com todos vocês nessa fase de encerramento. Muito obrigada!

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo detectar através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) a presença do fragmento do gene *lipL32* em fragmentos coletados de rins de suínos abatidos em frigoríficos localizados no Distrito Federal com o intuito de estudar a ocorrência da *Leptospira* spp., assim como identificar suínos portadores renais do agente. Foram coletadas amostras renais de 50 carcaças provenientes de animais oriundos de três propriedades diferentes. A PCR foi baseada na detecção do fragmento do gene *lipL32*, o qual é extremamente conservado em todas as cepas patogênicas da *Leptospira* spp. O resultado encontrado em todas as amostras do estudo foi negativo para a bactéria *Leptospira* spp. Em granjas com boas condições sanitárias, apesar de o risco de transmissão ser baixo, a leptospirose suína permanece como um assunto preocupante tanto para a Saúde Animal quanto para a Saúde Pública.

Palavras-chave: suíno, *Leptospira*, proteína LipL32, PCR

ABSTRACT

This study aimed to detect through the Polymerase Chain Reaction (PCR) the presence of *lipL32* gene in fragments collected from pig kidneys in slaughterhouses located in Distrito Federal in order to study the occurrence of the *Leptospira* spp. as well as identify renal carriers of the agent. Kidney samples from 50 animals from three different properties were collected. The PCR method was based on the detection of *lipL32* gene which is highly conserved in all strains of pathogenic *Leptospira* spp. The PCR was negative in all the surveyed kidney samples. In farms with good sanitary conditions, despite the low risk of transmission, swine leptospirosis remains a matter of concern both for Animal Health and for Public Health.

Key words: pigs, *Leptospira*, LipL32 protein, PCR

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUÇÃO.....	1
REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
Aspectos Históricos	3
Aspectos Microbiológicos	4
Classificação e Taxonomia.....	4
Composição, Características Morfológicas, Bioquímicas e de Cultivo	6
Biologia Molecular.....	9
Epidemiologia	11
Habitat	11
Hospedeiros.....	13
A Leptospirose na suinocultura.....	17
Transmissão, Patogenia e Sinais Clínicos.....	20
Diagnóstico	27
Métodos de Diagnóstico Direto.....	27
Métodos de Diagnóstico Indireto	29
Métodos Avançados de Diagnóstico Direto.....	32
Tratamento, Controle e Prevenção.....	33
OBJETIVO	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
CAPÍTULO II	49
Detecção de <i>Leptospira</i> spp. em rins de suínos abatidos em frigoríficos do Distrito Federal com amplificação do gene LipL32	Erro! Indicador não definido.
RESUMO.....	49
ABSTRACT.....	49
INTRODUÇÃO	50
MATERIAL E MÉTODOS	51

RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
CONCLUSÕES	58
APROVAÇÃO POR COMITÊ DE ÉTICA	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

A suinocultura no Brasil vem se qualificando como uma das atividades responsável pela manutenção do desenvolvimento econômico e social de muitos municípios e estados do país, gerando empregos no campo, na indústria e no comércio. No 3º trimestre do ano de 2015, o abate de suínos no Brasil foi recorde, apresentando o maior resultado desde o começo da pesquisa, iniciada em 1997. A região Sul é responsável pela grande maioria dos abates (66,6%), seguida pelas regiões Sudeste (18,2%), Centro-Oeste (14%), Nordeste (1,1%) e Norte (0,1%) (IBGE, 2015).

No cenário internacional, o Brasil segue como o quarto maior produtor e o quarto maior exportador de carne suína (ABPA, 2015). Essa realidade é responsável por mais investimentos na tecnologia de produção, manejo e, principalmente, na qualidade da certificação sanitária. No passado, problemas relacionados à sanidade do rebanho, como a peste suína clássica, foram prejudiciais à participação do Brasil no mercado internacional (CIAS, 2010). A sanidade do rebanho, além de interferir na exportação do produto final, faz a diferença entre o sucesso e o fracasso da criação suína.

Listada como uma doença de notificação obrigatória pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), a leptospirose é uma das principais doenças infecciosas dos suínos (OIE 2012). Considerada uma zoonose amplamente disseminada pelo mundo, além de afetar diversas espécies de animais domésticos e silvestres e representar riscos para a saúde pública, interfere diretamente nos índices produtivos da suinocultura (TRABULSI, 2005; OSAVA et al., 2010).

A leptospirose está entre as doenças bacterianas que podem gerar uma queda significativa nos índices reprodutivos e grandes prejuízos econômicos em granjas suínícolas (AZEVEDO et al., 2008). Abortamento, natimortalidade e mumificação fetal são alguns dos distúrbios reprodutivos encontrados nos plantéis suínos que entraram em contato com o agente infeccioso (HIRSH e ZEE, 2003; SANTOS et al., 2011).

A Organização Mundial de Saúde (WHO) estima que o comprometimento global da leptospirose humana ultrapasse um milhão de casos severos por ano, com crescente aumento no número de países notificadores de surtos da doença (WHO, 2010). Todos os sorotipos podem produzir doença nos seres humanos, porém as manifestações variam de acordo com o sorotipo envolvido. As infecções causam febre,

icterícia, dor muscular, exantemas, meningite não-suprativa e, em sua forma maligna, pode causar doença hepática ou renal fatal (FERNANDES, WILDNER e FURLANETTO, 2006).

Por se tratar de uma zoonose, a leptospirose também é classificada como uma doença de risco ocupacional, atingindo diferentes categorias profissionais como funcionários de matadouros-frigoríficos, magarefes, além de tratadores de animais e veterinários (FERNANDES, WILDNER e FURLANETTO, 2006). Desta forma, existindo ameaça à saúde pública, o índice de prejuízos decorrente da doença é ampliado. Em termos de saúde pública, o impacto da leptospirose dar-se-á devido ao alto custo do tratamento dos seres humanos acometidos, podendo apresentar letalidade de 5 a 20% (WHO, 2010).

Apesar dos distúrbios reprodutivos decorrentes de doenças infecciosas causarem tantos prejuízos à suinocultura do país, pesquisas e estudos abordando esse tema ainda são escassas. Atualmente, estados localizados na região Sul do país apresentam maior quantidade de estudos científicos relacionados à sanidade suídea. Diferentes resultados da prevalência da doença podem ser encontrados considerando que a ocorrência da doença sofre variações de acordo com o sistema de produção, manejo, clima, região e sorotipo infectante. Deste modo, a realização de pesquisas é necessária para o correto mapeamento da prevalência da leptospirose suína em cada estado do Brasil e, com isso, a adequada elaboração de medidas de controle e profilaxia para combater essa enfermidade.

Ainda que considerada endêmica no país, especialmente no Distrito Federal e Goiás, pouco se tem relatado sobre a importância das perdas provocadas pela doença, seja pelos óbitos dos animais ou pela queda significativa nos índices reprodutivos. É fundamental maior riqueza de dados que possam contribuir com seu controle e prevenção.

REFERENCIAL TEÓRICO

Aspectos Históricos

A história moderna da leptospirose começou em 1886 quando o médico alemão Adolf Weil descreveu em humanos uma doença denominada “*icterus catarrhalis*”. Os doentes apresentavam icterícia específica acompanhada de esplenomegalia, disfunção renal, conjuntivite e erupções cutâneas. Na época, pouco era conhecido sobre o curso da doença, que era classificada como uma síndrome infecciosa icterica com disfunção renal, posteriormente denominada como Doença de Weil (TORTEN e MARSHALL, 1994).

A primeira visualização do agente da leptospirose ocorreu em 1907 por Arthur Stimson. Através da coloração de prata, Stimson observou, acidentalmente, espiroquetas com as extremidades curvadas em rins de um paciente com febre amarela. Depois da descoberta, o organismo foi nomeado de *Spirochaeta interrogans* por se parecer com um ponto de interrogação (TORTEN e MARSHALL, 1994; CDC, 2013).

Contudo, o agente causador da Doença de Weil foi isolado somente alguns anos depois. Em 1915 dois grupos de pesquisadores isolaram o agente ao mesmo tempo. No Japão, Inada et al. (1916) detectaram espiroquetas no sangue de mineiros ictericos, as quais denominaram de *Spirochaeta icterohemorrhagia*. Enquanto na Alemanha, dois grupos de médicos isolaram o microrganismo de amostras provenientes de uma área próxima a Paris (TORTEN e MARSHALL, 1994).

Hideyo Noguchi (1917) estudou os microrganismos isolados por Inada et al. (1916) e os achou com morfologia semelhante à da espiroqueta saprófita (*Spirocheta biflexa*) isolada por Wolbach e Binger (1914) de água estagnada coletada de uma lagoa de água doce em Boston, nos Estados Unidos. Ao comparar os dois microrganismos, Noguchi (1917) constatou que o isolado japonês era morfologicamente diferente de todo o gênero das espiroquetas e assim sugeriu a criação de um novo gênero chamado *Leptospira*.

A leptospirose animal foi identificada em 1850 como uma entidade clínica separada, cerca de 30 anos antes de Weil descobrir a doença humana. Em 1898 uma epidemia em cães foi registrada em Stuttgart, na Alemanha. Mas somente 28 anos mais tarde, quando os agentes etiológicos foram descobertos, foi possível perceber que microrganismos com idêntica morfologia estavam causando a doença em cães e

humanos. No final dos anos 40 e início dos anos 50, a leptospirose em animais domésticos havia sido estabelecida como uma doença de importante significância tanto para a Medicina Veterinária quanto para a Medicina Humana (TORTEN e MARSHALL, 1994).

Aspectos Microbiológicos

Classificação e Taxonomia

A leptospirose é uma doença causada por espiroquetas patogênicas pertencentes ao reino *Bacteria*, ao filo *Spirochaetes*, à classe *Spirochaetes*, à ordem *Spirochaetales*, à família *Leptospiraceae* e ao gênero *Leptospira*. As espiroquetas compõem um dos poucos grandes grupos bacterianos cujas relações filogenéticas são evidentes em nível de características fenotípicas. Dentro do filo *Spirochaetes*, as leptospirosas formam o *cluster* mais profundamente ramificado (NOGUCHI, 1917; WOESE, 1987; PASTER et al., 1991). Sua morfologia e fisiologia são uniformes, porém, apresentam sorologia e epidemiologia diferentes (HIRSH e ZEE, 2003).

Duas formas de classificação coexistiam, uma delas constituía-se de critérios genéticos e a outra de determinantes antigênicos relacionados à reações sorológicas, onde o antissoro era utilizado para estabelecer parentesco entre as amostras (HIRSH e ZEE, 2003). A classificação tradicional foi baseada em determinantes antigênicos, onde o gênero *Leptospira* era dividido em duas espécies: *Leptospira interrogans*, compreendendo todas as cepas patogênicas, e *Leptospira biflexa*, contendo as cepas saprófitas isoladas do meio ambiente (FAINE e STALLMAN, 1982).

Contudo, estudos da década de 90 apontaram a ocorrência de sorotipos patogênicos e não patogênicos dentro de uma mesma espécie (HOOKEY, BRYDEN e GATEHOUSE, 1993). A comparação dos mapas genéticos de sorotipos de uma mesma espécie demonstrou evidência de grandes rearranjos, comprovando a existência de heterogeneidade intra-espécie (ZUERNER, HERRMANN e GIRON, 1993).

De acordo com Woese (1987), o método de escolha para a construção de níveis mais elevados e acurados de classificação é o sequenciamento da pequena subunidade 16S do rRNA. O método estuda os critérios genéticos das amostras, desta forma a classificação das espécies e diversos sorotipos será baseada no grau de parentesco do DNA.

Uma classificação mais complexa baseada na hibridização de DNA e detalhada na *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* (LPSN) reconhece 23 espécies identificadas e nenhuma subespécie no gênero *Leptospira* (BRENNER et al., 1999; LPSN, 2015).

Considerando as análises filogenéticas propostas por Woese (1987), essas espécies se dividem em três grupos: espécies patogênicas, espécies intermediárias e espécies saprófitas. As espécies patogênicas formam o maior grupo, ao todo são 10 espécies capazes de infectar e causar doença em humanos e animais: *L. interrogans*, *L. kirchneri*, *L. noguchii*, *L. alexanderi*, *L. weilii*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. kmetyi*, *L. mayottensis* e *L. alstonii*. As cinco espécies intermediárias do gênero *Leptospira* (*L. broomii*, *L. fainei*, *L. inadai*, *L. wolfii* e *L. licerasiae*) apresentam características patogênicas e saprófitas e foram isoladas de humanos e animais sendo a causa possível de uma variedade de manifestações clínicas moderadas. Por fim, o grupo das saprófitas é constituído por sete espécies: *L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. wolbachii*, *L. indonii*, *L. vanthielii*, *L. terpstrae* e *L. yanagawae* (FAINE e STALLMAN, 1982; PASTER et al., 1991; BRENNER et al., 1999; MATTHIAS et al., 2008; SAITO et al., 2013; SMYTHE et al., 2013).

Desde a proposta de criação do gênero *Leptospira* em 1917, a classificação taxonômica das bactérias que o compõem está em constante mudança e atualização. Quando um novo sorotipo é isolado, o mesmo adquire *status* de espécie. As espécies (sorotipos) com antígenos relacionados são agrupadas em sorogrupos (TORTEN e MARSHALL, 1994). Atualmente, todas as espécies de leptospiros reconhecidas estão divididas em 24 sorogrupos contendo ao todo mais de 300 sorotipos.

A divisão entre sorotipos foi baseada na expressão do lipopolissacarídeo (LPS) exposto na superfície da membrana externa das bactérias. A diferença estrutural do grupo de carboidrato do LPS de cada bactéria determinará a diversidade antigênica entre os numerosos grupos de sorotipos (ZIMMERMAN et al., 2012; HIRSH e ZEE, 2003). Com o avanço das técnicas de tipificação, bactérias previamente categorizadas como sorotipo, ou até mesmo desconhecidas, passaram a ser reconhecidas como uma nova espécie (YASUDA et al., 1987; MATTHIAS, et al., 2008; SAITO et al., 2013; SMYTHE et al., 2013). E, juntamente com o reconhecimento de novas espécies, outras estão sendo reclassificadas como por exemplo, a *L. parva* (LEVETT et al., 2005).

Yasuda et al. (1987) confirmaram através da hibridização de DNA a falta de relação existente entre a *L. parva* e as outras espécies do gênero *Leptospira*. Diante dessa confirmação, Levett et al. (2005) sugeriram a troca de gênero e de nomenclatura. A sugestão ainda aguarda validação. Porém, quando aceita, a *L. parva* pertencerá ao gênero *Turneriella* espécie *T. parva*. Enquanto isso, atualmente 23 espécies estão listadas na LPSN dentro do gênero *Leptospira*, sendo elas 10 patogênicas, cinco intermediárias, sete saprófitas e uma em reclassificação (*L. parva*) (LPSN, 2015).

Nos últimos 10 anos houve um ressurgimento em relação à pesquisa sobre a *Leptospira* spp. e a leptospirose. Na última década o número de artigos publicados dobrou em relação a qualquer década anterior e se igualou à quantidade de material publicado durante os 50 anos seguintes à descoberta da *Leptospira* spp. Com a adição de novas espécies e o desenvolvimento de novos mecanismos de tipificação, avanços e mudanças vêm ocorrendo na taxonomia e classificação das leptospirosas (SALAUN et al., 2006; SAITO et al., 2013; SLACK et al., 2006; SMYTHE et al., 2013; HAMOND, et al. 2015).

Composição, Características Morfológicas, Bioquímicas e de Cultivo

As leptospirosas (do grego *leptos*, fino, estreito; *spira*, espiral, hélice) possuem todas as características da ordem *Spirochaetales* e da família *Leptospiraceae*. São organismos delgados, flexíveis, móveis e espiralados 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” (WOLBACH e BINGER, 1914; TORTEN e MARSHALL, 1994, HIRSH e ZEE, 2003; TRABULSI, 2005, ZIMMERMAN et al., 2012). Todavia, Faine e Stallman (1982) relatam que em meio líquido, apesar das extremidades geralmente ter formato de gancho ou curvas, a maioria das células apresentam as extremidades curvas.

O organismo é facilmente visualizado por Microscopia de Campo Escuro (MCE) em preparações a fresco. Apesar de serem classificadas como Gram-negativas, as leptospirosas não são coradas pela técnica de Gram e sua observação em microscopia óptica convencional não é possível devido suas dimensões reduzidas. A bactéria ainda pode ser demonstrada por anticorpos fluorescentes, por impregnação pela prata,

imunoperoxidase ou por outro método de coloração especial (HIRSH e ZEE, 2003; TRABULSI, 2005; ZIMMERMAN et al., 2012).

As células das bactérias consistem em um cilindro protoplasmático helicoidal – o qual se constitui de material nuclear, citoplasma, membrana citoplasmática e a porção de peptidoglicano da parede celular - delimitado pelo complexo citoplasmático membrana-peptidoglicano (FAINE e STALMAN, 1982). Ainda possuem uma bainha externa que envelopa todo o organismo e duas fibrilas axiais (“endoflagelos”) inseridas uma em cada lado oposto do cilindro protoplasmático proporcionando a mobilidade da bactéria. Em meio líquido as bactérias possuem movimentos com rotação alternada ao longo do eixo e translação em direção à extremidade sem formato de gancho. Em meios mais viscosos observa-se movimentos de serpenteio e rolamento tortuoso (FAINE e STALMAN, 1982; HIRSH e ZEE, 2003).

As leptospiras são catalase positivas, oxidases negativas, quimiorganotróficas, capazes de utilizar ácidos graxos de cadeia longa como única fonte de carbono e energia; incapazes de metabolizar os açúcares e não necessitam de aminoácido para o crescimento. Muitas têm atividade de lipase, como por exemplo, o sorotipo patogênico Canicola, e algumas produzem urease. Apesar dessas pequenas diferenças, as exigências de crescimento nutricional em cultivo das espécies patogênicas são as mesmas (SHENBERG, 1967; HIRSH e ZEE, 2003; QUINN et al., 2005; ADLER e PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

São microrganismos aeróbios estritos que possuem melhor crescimento com pH entre 7.2 a 7.6 e temperatura acima de 13°C, principalmente entre 28 e 30°C. Em estudo, Johnson e Harris (1967) mostram como a temperatura de incubação influencia o crescimento das diferentes espécies patogênicas e saprófitas. A espécie saprófita, *L. biflexa*, continuou se multiplicando mesmo quando exposta a temperaturas baixas (10°C), tendo seu crescimento cessado quando confrontada com temperaturas abaixo de 10°C. Em contraste com a leptospira saprófita, a leptospira patogênica *L. interrogans* sorotipo Pomona não apresentou crescimento quando exposta a temperaturas de 10 a 13°C (JOHNSON e HARRIS, 1967).

A mudança de temperatura está diretamente relacionada com a necessidade de ácidos graxos. Portanto, o correto estabelecimento da temperatura e a manutenção da mesma são importantes para o cultivo e crescimento dessas bactérias. A tolerância das

espécies saprófitas é justificada devido ao ambiente natural em que as mesmas se encontram. No solo e água, as bactérias são expostas não apenas a variações de temperatura, mas também a variações em relação aos nutrientes disponíveis. Por serem mais adaptáveis, as bactérias saprófitas possuem as enzimas necessárias para utilizar ácidos graxos de cadeia curta como fonte de energia. Em contraste, o crescimento das espécies patogênicas dependerá da disponibilidade de ácidos graxos de cadeia longa encontrados no hospedeiro mamífero (JOHNSON, HARRIS e WALBY, 1969).

Apesar disso, 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; RISTOW et al., 2008). Todavia, a cepa também patogênica *L. borgpetersenii* não sobrevive fora do hospedeiro animal. Análises genômicas indicam que o gene desta cepa é bem menor do que o da cepa *L. interrogans*, resultando na perda de genes necessários para a sobrevivência fora do hospedeiro, limitando sua transmissão apenas através de contato direto de hospedeiro para hospedeiro (BULACH et al., 2006).

A temperatura mínima para crescimento adequado das espécies patogênicas está entre 13 e 15°C. Em temperaturas menores, o crescimento se mostrou extremamente lento, resultando em um tempo de geração de 401 horas. Em condições adequadas, o tempo de geração das leptospiras é em média de 6 a 14 horas. O período de incubação para excelente crescimento é geralmente de 6 a 14 dias, podendo variar de alguns dias até quatro semanas ou mais (AHMAD, SHAH e AHMAD, 2005).

As leptospiras não crescem em meio agar sangue ou em outro meio de rotina. O meio tradicional é, essencialmente, o de soro de coelho em soluções variáveis de salina a misturas de preparados de peptonas, vitaminas, eletrólitos e tampões. A grande maioria dos meios utilizados são líquidos ou semissólidos. Quando as células crescem em tubos com meio semissólido, um ou mais discos achatados são formados cerca de 0,5 cm abaixo da superfície. Em meio líquido, o crescimento é indicado por ligeira turbidez (HIRSH e ZEE, 2003; QUINN et al., 2005; PICARDEAU, 2013).

Biologia Molecular

Zuerner (1991) foi o primeiro pesquisador a demonstrar um mapa físico do genoma de uma espiroqueta. Utilizou em seu estudo *L. interrogans* sorotipo Pomona por ser uma das leptospiros patogênicas mais comumente encontradas no mundo. Os resultados demonstraram genoma de aproximadamente 5.000 kb de tamanho, contendo cromossomo circular de 4.400 kb e plasmídeo circular de 350 kb com potenciais genes codificadores de proteínas. O genoma da *L. interrogans* é muito maior quando comparado ao genoma de outras espiroquetas como, por exemplo, o *Treponema pallidum* e a *Borrelia burgdorferi* (REN et al., 2003).

A primeira leptospira saprófita a ser sequenciada foi a *L. biflexa*, apresentando um genoma com 3.590 genes codificadores de proteína. Apesar da *L. biflexa* ser considerada um excelente modelo para o estudo da evolução das bactérias pertencentes ao gênero *Leptospira*, aproximadamente um terço dos genes encontrados em seu genoma estão ausentes nas bactérias patogênicas (PICARDEAU et al., 2008).

A expressão das proteínas da membrana externa sofre variações de acordo com a patogenicidade e com a localização da bactéria – estando ela presente no meio ambiente, no animal infectado, no hospedeiro de manutenção ou sendo eliminada através da urina (HAAKE et al., 1998; HAAKE et al., 2000; NALLY et al., 2005; MONAHAN, CALLANAN e NALLY, 2008).

Estudos sugerem que a membrana externa das leptospiros tem um perfil de proteínas relativamente complexo (BROWN, LEFEBVRE e PAN, 1991). Até o início do século XXI, somente algumas proteínas da membrana haviam sido detalhadamente caracterizadas. Nos últimos anos, diversas proteínas de superfície das leptospiros têm sido identificadas e caracterizadas, incluindo as proteínas da membrana externa, LipL36, LipL41, LipL32, Loa22, proteínas da família Len e as proteínas Lig (HARTLEBEN et al., 2013).

A proteína da membrana externa LipL36 é um exemplo de proteína com expressão regulada pelo meio ambiente. Haake et al. (1998) demonstraram a expressão dessa proteína em altos níveis quando a bactéria era submetida a crescimento *in vitro* a 30°C, ou seja, em condições ambientais. O fato da proteína não ser expressa em tecido infectado ou em cultivo a 37°C indica uma resposta adaptativa do organismo à infecção, a qual incluiu a diminuição da expressão de LipL36.

De acordo com Haake et al. (2000), a proteína mais proeminente encontrada na membrana externa das leptospiras tem massa molecular de aproximadamente 32 kDa e é denominada como LipL32. Pesquisadores compararam as características da membrana externa da mesma bactéria em situações diferentes e concluíram que a LipL32 é expressa em altos níveis não somente durante o cultivo bacteriano, mas também durante a infecção de mamíferos, sendo sua sequência e expressão altamente conservadas entre as espécies patogênicas (NALLY et al., 2007).

Nally et al. (2005), comprovaram a importância da relação leptospira-hospedeiro, assim como diversificaram a infecção aguda de infecção crônica, através da análise da regulação da síntese do lipopolissacarídeo antígeno O (Oag) da membrana externa da *Leptospira interrogans* sorotipo Copenhageni. Além de ser um dos principais componentes da membrana externa das bactérias Gram-negativas, o LPS e o Oag associado são considerados importantes fatores de virulência em patógenos Gram-negativos.

A cepa foi recuperada de três diferentes procedências: tecido animal com infecção aguda experimental (porquinho-da-Índia), hospedeiro cronicamente infectado (rato) e de cultivo *in vitro*. Nos hospedeiros, a cepa testada causou apenas infecção assintomática e doença crônica com infecção restrita aos túbulos renais. Os animais experimentalmente infectados apresentaram infecção aguda com diminuição da síntese de Oag, sugerindo que síntese de Oag seja regulada dependendo da relação de adaptação entre o sorotipo e o hospedeiro (NALLY et al., 2005).

Em outro estudo, Monahan, Callanan e Nally (2008) pesquisaram pela primeira vez o proteoma de leptospiras disseminadas na urina de animais cronicamente infectados. A análise do proteoma das leptospiras isoladas da urina comparada com a do proteoma de leptospiras cultivadas *in vitro* confirmou as diferenças entre a expressão de proteínas e de antígenos. A diminuição da expressão de antígenos observada na bactéria da amostra de urina sugere que a expressão desses antígenos pode ser infra-regulada em hospedeiros de manutenção manifestando doença crônica, podendo estar relacionada à liberação das leptospiras dos tecidos para a urina. Desta forma, a expressão de proteínas e antígenos pelas leptospiras pode variar dependendo das condições do hospedeiro, sendo ele de manutenção ou acidental.

Epidemiologia

Habitat

Quando a temperatura ambiental é favorável, as leptospiras podem sobreviver em lagoas, rios, superfícies d'água, solos úmidos e lamas (TRABULSI, 2005). As cepas patogênicas sobrevivem em solo úmido e água doce por longos períodos de tempo, especialmente quando o pH é levemente alcalino (LEVETT, 2001). Dados experimentais sugerem que a sobrevivência em água de algumas cepas da *L. borgpetersenii* é bastante reduzida quando comparada com cepas da *L. interrogans*. A *L. borgpetersenii* sorotipo Hardjo perdeu 90% de viabilidade depois de 48 horas em água, enquanto a *L. interrogans* manteve 100% de viabilidade durante o mesmo período (BULACH et al., 2006). O sorotipo Pomona pode persistir em até seis meses em solos saturados de umidade. Porém, em condições desfavoráveis, seja devido à exposição a altas temperaturas (50°C) ou à desidratação, sobrevivem por apenas 30 minutos (LEVETT, 2001).

Por se tratar de um patógeno, a expectativa de sobrevivência por longos períodos é maior em soluções salinas isotônicas do que em água. Contudo, Trueba et al. (2004) demonstraram o comprometimento da sobrevivência das leptospiras patogênicas em meios com concentração de NaCl a 0,85%, sobrevivendo por apenas 2 semanas. Enquanto em água destilada com pH de 7,2, a sobrevivência e motilidade se mantiveram até 110 dias.

Essas diferenças entre nichos ecológicos refletem a composição genômica das espécies de leptospiras. O rearranjo dos genomas pode afetar a habilidade de percepção do ambiente externo, onde cepas com genomas menores e menos resistência ambiental possivelmente estejam iniciando o processo de especialização em transmissão direta. E cepas com genomas maiores, por exemplo, a *L. interrogans*, possuem vários genes com percepção ambiental e apresentam grandes mudanças na expressão da proteína quando removida de um meio com características semelhantes ao meio ambiente para um meio semelhante a um hospedeiro (BULACH et al., 2006; COSSON et al. 2014).

Quando a bactéria invade um novo meio - seja ele o meio ambiente, o hospedeiro ou superfícies abióticas - pode assumir duas formas: a forma planctônica, na qual a bactéria circula isoladamente ou a forma de biofilme, quando bactérias isoladas fazem adesão às superfícies abióticas (plásticos, vidros, metais e minerais) ou bióticas

(plantas e tecidos animais) e começam a se agregar e a produzir uma matriz onde microcolônias são formadas. A partir da formação de microcolônias o biofilme é gerado (PASTERNAK, 2009).

A capacidade de formação de biofilme pelas leptospiras patogênicas e saprófitas foi estudada pela primeira vez em 2008 por Ristow e pesquisadores. As cepas patogênicas e as saprófitas são capazes de formar biofilme associado à superfície abiótica. Juntamente com a capacidade de agregação celular demonstrada por Trueba et al. (2004), a formação de biofilme pode ser responsável pelo prolongamento do tempo de sobrevivência e representar importante papel na manutenção das bactérias em diferentes habitats, incluindo o hospedeiro.

Pequenas diferenças estruturais e de tempo de formação do biofilme foram encontradas entre as espécies patogênicas e saprófitas. As bactérias saprófitas capazes de desenvolver biofilme em menor tempo (2 a 5 dias) em comparação às espécies patogênicas (20 dias). Ademais, assim como o crescimento em cultivo, a formação dos biofilmes também sofre influência direta com a mudança temperatura. Cepas saprófitas apresentaram produção de biofilme quando deparadas com diferentes temperaturas, enquanto as cepas patogênicas demonstraram ter produção de biofilme limitada a certas temperaturas. Fato que pode estar correlacionado com a filogenética e diferenças entre o modo de vida de ambas as cepas (RISTOW et al., 2008).

Em biofilmes, os organismos se tornam mais resistentes aos antibióticos e apresentam sobrevivência mais duradoura quando encontrados em água ambiental. Além disso, quando outras espécies interagem no mesmo biofilme, pode haver transferência genética entre os microrganismos (GANOZA et al., 2006). Segundo Singh et al. (2003), as leptospiras saprófitas estão entre os organismos mais comumente encontrados em biofilmes multibacterianos formados em encanamentos de água. E apesar de Ganoza et al. (2006) demonstrarem que cada vez mais casos de leptospirose severa estão sendo relacionados à altas concentrações de leptospiras patogênicas em amostras ambientais de água, muito ainda há de ser explorado sobre a distribuição e o natural habitat das diferentes espécies de leptospiras.

A capacidade de formação de biofilmes pelas cepas patogênicas pode ter grande relevância na manutenção dos portadores crônicos como reservatório da doença, porém, mais estudos ainda são necessários para determinar a fundamental importância dos

mecanismos de colonização da bactéria nos rins dos animais reservatórios (RISTOW et al., 2008).

Hospedeiros

Os sorotipos das leptospiros parasitárias têm hospedeiro, distribuição geográfica e patogenicidade variáveis. Muitos sorotipos estão associados e adaptados a uma espécie específica, caracterizado como hospedeiro de manutenção (HIRSH e ZEE, 2003; TRABULSI, 2005).

Ainda assim, a preferência do sorotipo por uma determinada espécie hospedeira não é uma característica constante e tende a sofrer *shifts* com certa frequência. O *shift* em relação à preferência de um hospedeiro a outro ocorre provavelmente por causa do estresse epidemiológico, colocando em perigo a sobrevivência do sorotipo na natureza. A adaptabilidade de um sorotipo a um novo hospedeiro, mesmo não necessariamente havendo aumento da virulência clínica, pode mudar drasticamente o *status* epidemiológico local da doença (TORTEN e MARSHALL, 1994).

Os hospedeiros de manutenção albergam a bactéria patogênica em seus túbulos renais ou no trato genital, funcionando como um reservatório da infecção, visto que a bactéria será disseminada através da urina e transmitida em um contínuo ciclo de pais para prole. Quando o sorotipo não é adaptado ao hospedeiro, tem-se como consequência uma infecção aguda com ampla variedade de sinais clínicos (Quadro 01) (HIRSH e ZEE, 2003; QUINN et al., 2005; ZIMMERMAN et al., 2012).

Os hospedeiros de manutenção são pouco afetados pela doença, os sinais clínicos são manifestados de forma subclínica ou moderada, porém, por eliminarem a bactéria na urina, possuem fundamental importância na perpetuação da doença, assim como na infecção de outros animais e humanos. A leptospiúria em hospedeiros de manutenção é bastante intensa, constante e de longa duração quando comparada com a de hospedeiros acidentais, onde a intensidade é baixa, a eliminação é intermitente e de curta duração (QUINN et al., 2005; HIRSH e ZEE, 2003).

Dentre as espécies domésticas e silvestres, os roedores são os hospedeiros de manutenção mais importantes da leptospirose, seguidos por animais domésticos (cães, bovinos, suínos, equinos) e mamíferos silvestres (HARTSKEERL e TERPSTRA, 1996; HIRSH e ZEE, 2003). Atuando como reservatórios ou portadores do agente, os roedores

podem disseminar bactérias e vírus patogênicos diretamente para animais de produção e indiretamente para os humanos (TRUONG et al., 2013).

Sorotipos adaptados ao hospedeiro	Sorotipos não adaptados ao hospedeiro
A espécie afetada é o reservatório	Dependente de outras espécies
Ocorrência frequente	Ocorrência não frequente
Endêmico	Endêmico (surto)
Pouco influenciado por fatores ambientais	Dependente de fatores ambientais
Crônica ou sub-clínica	Aguda
Doença silenciosa	Ampla variedade de sinais clínicos
IgG predominante	IgM predominante

Quadro 01 – Comparação da epidemiologia da infecção causada pelo sorotipo adaptado ao hospedeiro com a infecção causada pelo sorotipo não adaptado ao hospedeiro (Adaptado de LOUREIRO et al., 2013).

Nos roedores, as leptospirosas podem ser eliminadas pela urina desde o 6º dia pós-infecção, até o 159º dia, em concentrações crescentes de 10^5 a 10^7 por mililitro (mL) de urina (MONAHAN, CALLANAN e NALLY, 2008). As taxas de infecção são significativamente maiores em épocas de chuva e quando a população de hospedeiros de manutenção está elevada como, por exemplo, a dos ratos. A transmissão de leptospirosas do meio ambiente para os roedores é muito mais favorável em épocas de chuva. A justificativa está na maior resistência e sobrevivência da bactéria quando exposta às condições proporcionadas pelo clima, aprimorando a transmissão da doença (IVANOVA et al., 2012).

A distribuição das leptospirosas está diretamente relacionada com a presença do hospedeiro animal e condições ambientais locais que favoreçam a sobrevivência e a manutenção da bactéria fora do hospedeiro. Os roedores são os principais hospedeiros dos seguintes sorotipos: *Icterohaemorrhagiae* e *Grippotyphosa*. Ainda assim, uma espécie específica de roedor pode carrear sorotipos distintos em diferentes áreas geográficas (HIRSH e ZEE, 2003; TORTEN e MARSHALL, 1994). Em estudo, Cosson et al. (2014) confirmaram através da tipificação de cepas *L. interrogans* e *L. borgpetersenii* que os roedores são importantes reservatórios da leptospirose humana e

animal. Mayer-Scholl et al. (2014) também validam essa informação ao pesquisarem a espécie e encontrar em maiores quantidades as cepas *L. kirschneri*, *L. interrogans* e *L. borgpetersenii*.

Agudelo-Flórez et al. (2009) encontraram anticorpos para outros sorotipos de leptospiros (Canicola, Bratislava, Hardjo e Pomona) em roedores (*R. norvegicus*). Achado esse que sugere contato entre roedores e outros hospedeiros de manutenção, tais como os cães, equinos, bovinos e suínos. Truong et al. (2013) pesquisaram a prevalência de patógenos bacterianos em roedores capturados nos arredores de fazendas suínas e determinaram a *Leptospira* spp. como o agente bacteriano mais prevalente, demonstrando a importância dessa espécie na transmissão e manutenção da leptospirose suína.

Alguns estudos têm investigado a prevalência da *Leptospira* spp. em roedores e outros pequenos mamíferos em seus diversos habitats. Bunnell et al. (2000) demonstraram que vários pequenos mamíferos (roedores, marsupiais e morcegos) estudados na região da Amazônia Peruana são frequentemente infectados com leptospiros patogênicos, funcionando como provável fonte de infecção ambiental para humanos, animais domésticos e silvestres. A maioria dos estudos sobre a presença das leptospiros em roedores tem sido conduzida em áreas urbanas ou em áreas rurais próximas a agregados familiares e ambientes domésticos (FARIA et al., 2008).

Ivanova et al. (2012) pesquisaram variadas espécies de roedores hospedeiros (silvestres e domésticos) em regiões com diferentes aspectos climáticos do Camboja. Os autores demonstraram que os roedores habitantes de áreas rurais, ou aqueles que vivem em suas proximidades, apresentam maiores níveis de infecção quando comparados aos encontrados em ambientes domésticos. Reafirmando esses resultados, Cosson et al. (2014) também encontraram baixos níveis de infecção em roedores capturados em ambientes domésticos nos países do sudeste Asiático.

Na Alemanha, para entender melhor a ocorrência e a distribuição da doença, Mayer-Scholl et al. (2014) examinaram pela PCR os rins de 2973 roedores capturados em diferentes regiões do país. As espécies de roedores estudadas foram variadas e os roedores com maiores níveis de infecção e prováveis hospedeiros da doença pertencem às espécies silvestres. Em contraposição, Turk et al. (2003) relataram que camundongos de uma área urbana estudada na Croácia apresentaram as maiores taxas de infecção

entre os hospedeiros analisados, confirmando o papel desses roedores como os principais reservatórios da localidade.

No Brasil, Faria et al. (2008) levantaram dados sobre as espécies domésticas de ratos encontradas em áreas urbanas e constataram prevalência da bactéria de 80,3% nos *R. norvegicus*. Arango et al. (2001) encontraram prevalência um pouco mais baixa (45,8%) quando pesquisaram a mesma espécie de roedor em Buenos Aires, na Argentina. Enquanto Agudelo-Flórez et al. (2009) em Medellín, na Colômbia, encontraram uma prevalência de 23%. Estes resultados corroboram com o importante papel dos ratos domésticos como hospedeiros das leptospiros patogênicas aos humanos.

Ainda no Brasil, altos níveis de infestação de roedores e a predominância do *R. norvegicus* são frequentes elementos encontrados em áreas de favela ou áreas com precárias condições de saneamento. Costa et al. (2014) constataram alto índice de infestação por *R. norvegicus* em casas de favelas no Brasil, indicando alto grau de transmissibilidade da doença para os habitantes e animais domésticos.

Em oposição aos resultados encontrados na América do Sul, Ivanova et al. (2012), pesquisaram no Camboja e acharam dados intrigantes e incomuns onde nenhum dos *R. norvegicus* testados apresentou infecção. Tais diferenças podem ser explicadas pela diversidade epidemiológica da doença em diferentes países.

As diferenças em relação ao habitat e hospedeiros das leptospiros sustentam os muitos meios de transmissão da doença e não restringem o risco apenas às atividades que envolvem áreas úmidas ou alagadas, ou a regiões com precário saneamento e alta infestação de ratos domésticos. Atualmente existem diversas rotas alternativas para a infecção e fica cada vez mais explícita a necessidade de mais estudos e dados para um amplo entendimento do nicho ecológico dos roedores e das leptospiros (COSSON et al., 2014).

Cosson et al. (2014) verificaram que os ratos machos apresentam maior suscetibilidade à infecção do que as fêmeas. Segundo os pesquisadores, essas diferenças entre as taxas de infecção entre os sexos podem ser justificadas devido às interações imuno-endócrinas. Os hormônios androgênicos tem efeito imunossupressor, o que explicaria uma queda no sistema imune e a associação às altas taxas de infecção. Além disso, hormônios esteroides alteram o comportamento do roedor macho – ficam mais

agressivos, dispersam e percorrem áreas maiores e aumentam as atividades em busca de alimento. Todos esses comportamentos aumentam a exposição do mesmo ao patógeno.

Para os hospedeiros de manutenção, por se tratar de uma doença crônica e não letal, a prevalência da infecção aumenta de acordo com a idade dos animais, ou seja, hospedeiros adultos tem maior probabilidade de estarem infectados do que hospedeiros juvenis (IVANOVA et al., 2012). No entanto, em estudos semelhantes, Agudelo-Flórez et al. (2009) e Mayer-Scholl et al. (2014) não verificaram associação entre as variáveis independentes (sexo e idade) com o status de infecção do hospedeiro, portanto, a relação de tais fatores com a transmissibilidade da leptospira ainda é incerta.

Contudo, ainda que os roedores sejam os hospedeiros mais importantes, nenhum mamífero pode ser excluído como provável hospedeiro. As espécies domésticas também têm grande relevância na epidemiologia e transmissão da leptospirose. Os bovinos são os hospedeiros de manutenção dos sorotipos Pomona e Hardjo. Os cães são hospedeiros do sorotipo Canicola, e na espécie suína, os sorotipos mais comumente encontrados, infectando e causando a doença são: Bratislava, Icterohaemorrhagiae, Canicola, Gryppotyphosa, Tarassovi, Muenchen e Pomona (FAVERO et al., 2002; AZEVEDO et al., 2008; MIRAGLIA et al., 2008; OSAVA et al., 2010; RAUBER-JUNIOR et al., 2011; ZIMMERMAN et al., 2012).

A leptospirose na suinocultura

Em diversos lugares do mundo os suínos são considerados os animais domésticos mais comumente afetados pela leptospirose (TORTEN e MARSHALL, 1994). Apesar de ser mais comum em regiões tropicais ou ambientes rurais, a leptospirose é considerada um problema pouco reconhecido, principalmente em locais onde a falta de saneamento básico favorece a transmissão de doenças por roedores. A bactéria é transmitida de um mamífero infectado para outro através do contato direto entre os animais ou indireto com a urina de animais portadores ou doentes (LEVETT, 2001).

A epidemiologia da leptospirose suína é complexa, uma vez que os suínos podem ser infectados por qualquer um dos sorotipos patogênicos (ZIMMERMAN et al., 2012). O conhecimento da prevalência de sorotipos e a associação com o hospedeiro de manutenção são essenciais para entender a epidemiologia da doença em uma região

(COSSON et al., 2014; MAYER-SCHOLL et al., 2014). A leptospirose é uma doença que demonstra uma forte relação entre o ambiente natural, e cada sorotipo tende a ser mantido pelo seu hospedeiro de manutenção. Portanto, em qualquer região, os suínos serão infectados por sorotipos mantidos por suínos ou por outra espécie animal presente na mesma área geográfica (ZIMMERMAN et al., 2012).

A *L. interrogans* é um dos agentes mais importantes causadores de falha reprodutiva em suínos de todo o mundo. Os sorotipos que infectam suínos variam em cada país (MILLER et al., 1990). Nos Estados Unidos e no Canadá os sorotipos mais associados à leptospirose suína são: Bratislava, Pomona e Grippotyphosa. Nesses países, infecções com o sorotipo Canicola e Icterohaemorrhagiae são identificadas ocasionalmente. Na Europa, o sorotipo Bratislava foi o mais relevante durante muitos anos, porém, hoje em dia, os sorotipos de importância na suinocultura são: Pomona, Icterohaemorrhagiae, Sejroe, Australis e Grippotyphosa. No Brasil a infecção suína é comumente associada aos seguintes sorotipos: Pomona, Icterohaemorrhagiae, Tarassovi e Canicola (BOLIN, 1994; SOBESTIANSKY et al., 1999; ZIMMERMAN et al., 2012; MILAS et al., 2013; WASINSKI, 2014).

Segundo Zuerner, Herrmann e Girons (1993) é provável que a larga distribuição das espécies de leptospiros seja explicada pela habilidade de sobrevivência das cepas em diversas condições ambientais combinada com as adaptações genéticas, o que reflete a flexibilidade do genoma bacteriano. Além disso, a suposta mudança em relação à prevalência dos variados sorotipos é possivelmente um reflexo do uso difundido das vacinas contendo os sorotipos Pomona, Grippotyphosa, Canicola e Icterohaemorrhagiae (KOIZUMI e WATANABE, 2005; OIE, 2012).

Infecções por sorotipos não adaptados ao hospedeiro, ou seja, ao hospedeiro acidental, costumam manifestar sinais clínicos bastante evidentes e são transmissores ineficientes para outros animais. O principal sorotipo adaptado aos hospedeiros é o Pomona. Este sorotipo tem sido o mais comumente isolado em suínos do mundo todo, sendo a causa da difusão da leptospirose clínica em suínos na América do Norte, América do Sul, Austrália, Nova Zelândia, partes da Ásia e região Leste e Central da Europa (ZIMMERMAN et al., 2012).

Suínos infectados com o sorotipo Pomona apresentam altos títulos de anticorpos anti-leptospira no soro sanguíneo, sendo o estado de portador renal bastante variável,

podendo eliminar as leptospirosas em sua urina durante longos períodos (BOLIN, 1994). A infecção pelo sorotipo Hardjo é mantida pelos bovinos. No entanto, quando bovinos e suínos são criados juntos, em contato direto, a probabilidade de suínos se infectarem por esse sorotipo é alta. Apesar de haver relatos sobre o isolamento do sorotipo Hardjo de suínos doentes, a persistência da bactéria em tecido renal não foi demonstrada em infecção experimental, portanto, a transmissão intra-espécie é improvável (HIRSH e ZEE, 2003; ZIMMERMAN et al., 2012).

Apesar de evidências sorológicas da infecção suína pelo sorogrupo Icterohaemorrhagiae terem sido relatadas em diversos países, poucos isolamentos foram realizados. Ambos os sorotipos, Icterohaemorrhagiae e Copenhageni, podem estar envolvidos e provavelmente foram introduzidos aos rebanhos suscetíveis através de contaminação do meio ambiente com urina do *R. norvegicus* – o hospedeiro de manutenção desses sorotipos (DELBEM et al., 2004).

No Brasil, apesar da leptospirose suína estar associada aos sorotipos Tarassovi e Canicola, há muito menos informação sobre a epidemiologia da infecção causada por ambos os sorotipos (SOBESTIANSKY et al., 1999). Há alguns anos, o suíno era tido como hospedeiro de manutenção de algumas cepas do sorotipo Tarassovi encontradas na Europa oriental e Austrália, mas a constante queda da soro-prevalência desse sorotipo passou a sugerir o contrário (WASINSKI 2007). Muitas cepas do sorotipo Tarassovi têm sido recuperadas de animais de vida livre, fornecendo suporte à ideia de que as infecções em suínos causadas por esse sorotipo são acidentais e consequência do contato com animais silvestres (ZIMMERMAN et al., 2012).

O mesmo acontece com o sorotipo Canicola. O conhecimento convencional é que a infecção é adquirida através do contato direto ou indireto com cães – o hospedeiro de manutenção reconhecido para este sorotipo – embora animais silvestres também possam atuar como fonte de infecção (HIRSH e ZEE, 2003; ADLER e PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

Ainda que o sorotipo Bratislava tenha emergido como o maior sorotipo mantenedor da leptospirose suína, o mesmo é pobremente entendido devido à dificuldade de cultivo dessas cepas. Dados sorológicos indicam que a infecção está disseminada na Europa, Estados Unidos, Canadá, Austrália, Brasil, África do Sul, Nigéria, Coreia e Japão. Em contraste com a alta soro-prevalência relatada no mundo

todo, o sorotipo Bratislava foi recuperado de suínos em poucos países (ZIMMERMAN et al., 2012).

O último avanço em relação aos sorotipos isolados de suínos no Brasil aconteceu no Rio de Janeiro. Hamond et al. (2015) isolaram e caracterizaram pela primeira vez o agente *Leptospira interrogans* sorogrupo Australis de suínos adultos de ambos os sexos, sem problemas reprodutivos, não vacinados e não submetidos a tratamento. Nove dos quinze animais testados foram reativos contra o sorogrupo Australis sorotipo Bratislava, confirmando a circulação das cepas deste sorogrupo na região, apontando novas perspectivas epidemiológicas da leptospirose animal no país.

Transmissão, Patogenia e Sinais Clínicos

A transmissão da doença ocorre por mecanismos diretos e indiretos. Sabe-se que o microrganismo é mais efetivamente transmitido por contato direto do animal doente/portador com o animal sadio. Porém, quando as condições ambientais são favoráveis, a transmissão indireta também pode ocorrer. A eliminação da bactéria pela urina do animal portador é uma das principais vias de transmissão indireta da enfermidade para mamíferos que entram em contato com águas superficiais e solo contaminado (TRABULSI, 2005; ADLER e PENÃ MOCTEZUMA, 2010).

A água é o fator epidemiológico mais importante da leptospirose. A presença de água estagnada próximo às baias dos suínos é um dos principais meios de transmissão da doença. Geralmente, a infecção em granjas de engorda é causada por contaminação do sistema de drenagem com urina de um animal doente ou portador (ZIMMERMAN et al., 2012).

As leptospirosas têm uma afinidade particular pelos rins de suínos infectados, onde elas persistem, multiplicam-se e são eliminadas na urina. Esse aspecto é muito importante na transmissão da infecção. A leptospiúria tem características diferentes quando comparamos mamíferos carnívoros com os herbívoros. A urina dos carnívoros possui o pH um pouco mais baixo, ou seja, mais ácido. Esse detalhe torna os carnívoros animais portadores de curta duração, sendo que as leptospirosas excretadas juntamente com a urina geralmente são danificadas por sua acidez (HIRSH e ZEE, 2003; QUINN et al., 2005).

Por outro lado, os herbívoros mantêm o estado de portador renal por tempo maior. A urina dos mamíferos herbívoros é levemente alcalina, fator necessário para a manutenção da virulência e sobrevivência das leptospiros. De todos os animais domésticos, os suínos parecem ter o pH da urina menos prejudicial às leptospiros, variando de 4.8 a 7.1. Essa característica, juntamente com a produção intensiva de suínos, funciona como um grande incentivo para a ocorrência de infecções cruzadas entre os suínos, outros animais e seres humanos em contato (TORTEN e MARSHALL, 1994).

A duração e intensidade da leptospiúria variam de suíno para suíno e também dependem do sorotipo infectante. Na infecção pelo sorotipo Pomona a intensidade da excreção é maior e constante durante os primeiros meses, quando mais de um milhão de leptospiros podem estar presentes em cada mL de urina. Em alguns casos, a intensidade da eliminação da bactéria pela urina é maior na terceira ou quarta semana de infecção, depois há um declínio seguido de intermitência por período variável, podendo perdurar por até dois anos (ZIMMERMAN et al., 2012).

Quando os suínos são infectados pelos sorotipos Icterohaemorrhagiae ou Copenhageni, a leptospiúria dura menos do que 35 dias e a transmissão intra-espécie é ineficiente. Nas infecções pelo sorotipo Bratislava, apesar do estado de portador renal ser estabelecido, a excreção urinária da bactéria é muito baixa quando comparada com a do sorotipo Pomona, sendo a transmissão intra-espécie também ineficiente. Em contrapartida, o longo período de leptospiúria observado em suínos infectados pelo sorotipo Canicola, pelo menos 90 dias, e a habilidade do sorotipo em sobreviver mais de seis dias em urina não diluída, sugerem a possibilidade de transmissão intra-espécie (ZIMMERMAN et al., 2012).

Características favoráveis do ambiente, do manejo e das instalações, uma granja suína pode oferecer múltiplas formas para garantir a viabilidade, permanência e transmissão da leptospirose (SOBESTIANSKY et al., 1999).

A infecção pode ser introduzida a um rebanho suscetível através de três possíveis rotas: introdução de animais doentes ao rebanho, exposição de animais suscetíveis a um ambiente ou a fômites contaminados (água, alimento) ou contato com vetor animal infectado. Os suínos portadores são provavelmente a mais comum rota de introdução. A reposição de leitões ou varrões infectados tem sido identificada como um

importante meio de introdução da infecção, ainda mais levando em conta que a transmissão venérea da infecção pelo sorotipo Bratislava é relevante na disseminação da doença (ZIMMERMAN et al., 2012).

Certificando a importância da água como fator epidemiológico da doença, Delbem et al., (2004) pesquisaram os fatores de riscos associados à soro-positividade para leptospirose em matrizes suínas e justificaram a maior ocorrência de animais infectados pelo sorotipo Icterohaemorrhagiae em razão a três variáveis, todas elas relacionadas à água. Os resultados do trabalho mostraram que o maior risco de infecção está relacionado ao uso do bebedouro tipo canaleta, aumentando o risco de o animal ser soro-reativo para leptospirose quando comparado ao uso do bebedouro automático; pertencer a uma propriedade onde existem áreas alagadiças próximas às instalações; e não ter o reservatório de água regularmente higienizado.

Os resultados encontrados por Delbem et al. (2004) propõem fortemente que a fonte de infecção geralmente envolvida na doença dos suínos seja os roedores. As leptospirosas vêm sendo lançadas para o meio ambiente principalmente através da urina de roedores, permanecendo nas coleções de água parada e desta forma dispendo de condições para sobreviver e alcançar um suíno suscetível (GANOZA et al., 2006; SUGUNAN et al., 2009; ADLER e PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

Contudo, a rota de infecção natural mais importante para a leptospirose suína ainda não foi determinada. A doença toma curso quando, após penetração da pele lesionada ou íntegra, mucosas (conjuntival, digestiva e respiratória) ou trato reprodutivo, as espiroquetas se multiplicam na corrente sanguínea, linfa e líquido cérebro-espinhal, caracterizando a fase leptospirêmica da doença, onde as leptospirosas se espalham pelo organismo do hospedeiro e começam a colonização dos órgãos (ADLER e PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

A adesão das leptospirosas ao tecido do hospedeiro é considerada como um passo inicial e necessário para a infecção e patogênese. Assim como outros patógenos, as leptospirosas produzem componentes de superfície microbiana que podem mediar a colonização do hospedeiro. A ligação às células do hospedeiro e aos componentes da matriz extracelular é necessária para favorecer as leptospirosas em sua capacidade de penetração, disseminação e persistência no hospedeiro mamífero (SCHWARZ-LINEK, HOOK e POTTS, 2004). Em crescimento *in vitro* a *L. interrogans* se liga a uma

variedade de linhas celulares, incluindo fibroblastos, monócitos/macrófagos, células endoteliais e células epiteliais renais (BREINER et al., 2009).

O período de bacteremia começa um ou dois dias após a infecção e pode durar aproximadamente uma semana. Durante esse período, as leptospiros podem ser isoladas da maioria dos órgãos e também do líquido cérebro-espinhal (HIRSH e ZEE, 2003). A fase de bacteremia acaba com o surgimento de imunoglobulinas circulantes detectáveis depois de 5 a 10 dias do início da infecção. Essas imunoglobulinas opsonizam as bactérias, retirando-as da corrente sanguínea. Quando o sistema imune do hospedeiro tem uma resposta efetiva retirando as leptospiros da corrente sanguínea e conseguindo se recuperar dos danos causados, dá-se início a segunda fase da doença, caracterizada principalmente por leptospiúria (BHARTI et al., 2003). Em infecções experimentais pelo sorotipo Hardjo, a fase de bacteremia tem sido identificada em dois momentos distintos, onde um período secundário de bacteremia tem sido demonstrado (ZIMMERMAN et al., 2012).

Contudo, quando a resposta imune do hospedeiro está em sua fase inicial ou quando é ineficiente, as bactérias persistem na corrente sanguínea e seguem colonizando diversos órgãos do organismo, em especial os rins e o fígado (ADLER e PEÑA MOCTEZUMA, 2010). Provavelmente, por receberem menor suprimento sanguíneo, locais como o interstício renal são relativamente protegidos pelo ataque imunológico. Desta forma, a colonização bacteriana do lúmen dos túbulos renais do animal hospedeiro é facilitada e a disseminação das leptospiros através da urina ocorre (BHARTI et al., 2003; MONAHAN, CALLANAN e NALLY, 2009).

As bactérias também afetam os músculos, olhos e meninges, em alguns casos desenvolvendo meningite não supurativa. Uma vez que as leptospiros lesam o endotélio vascular, hemorragias também podem ocorrer. Além disso, icterícia por lesão hepática e nefrite aguda, subaguda ou subcrônica por lesão renal tubular podem aparecer como alterações secundárias (HIRSH e ZEE, 2003).

As leptospiros também podem ser encontradas em úteros de fêmeas prenhes. A infecção intrauterina no último terço do período de gestação pode resultar em abortos, natimortos e neonatos doentes. Abortos e natimortos geralmente ocorrem de 1 a 4 semanas pós-infecção da fêmea prenhe, quando a maioria das porcas apresentam títulos de anticorpos detectáveis. Em razão de os fetos suínos serem capazes de produzir

anticorpos durante o estágio final de gestação, alguns natimortos poderão apresentar títulos em níveis detectáveis de 1/100 (AZEVEDO et al., 2008; ZIMMERMAN et al., 2012).

A patogenia da doença reprodutiva é pobremente entendida, mas alguns autores acreditam que a infecção transplacentária resultante do limitado período de leptospiremia materna seja a causa única. Enquanto essa teoria é aceita nos casos de infecção sistêmica causada pelo sorotipo Pomona, o mesmo não acontece quando a infecção é causada pelo sorotipo Bratislava. A baixa titulação de anticorpos em leiteos infectados por esse sorotipo sugere que a infecção seja resultado da incapacidade da imunidade uterina em prevenir a infecção transplacentária pelas leptospiros presentes no trato reprodutivo. A partir do momento em que a barreira placentária é rompida, a septicemia resultará em um grande número de leptospiros em todos os tecidos fetais (ZIMMERMAN et al., 2012)

Leitões não infectados durante o período de leptospiremia materna podem vir a contrair a doença através da transmissão horizontal por meio do leite. Por causa das imunoglobulinas encontradas no colostro, os leitões estão protegidos passivamente apenas durante as primeiras semanas de vida, podendo desenvolver a infecção com aproximadamente 12 semanas de idade (ZIMMERMAN et al., 2012).

Ainda envolvendo a doença reprodutiva, uma característica adicional observada na infecção causada pelo sorotipo Bratislava, e não registrada em infecções por outros sorotipos, é a persistência de leptospiros no oviduto e útero de fêmeas não prenhes e no trato reprodutivo de varrões (OLIVEIRA et al., 2007).

Dois situações distintas podem resultar em consequência da infecção por *Leptospira* spp.: a forma crônica, quando os hospedeiros de manutenção são clinicamente assintomáticos e atuam como reservatório da doença. Esse estado de portador consiste em infecção crônica restrita aos túbulos renais e na disseminação de leptospiros para o ambiente através da urina. Em outra situação, quando hospedeiros acidentais entram em contato com a bactéria, tem-se como consequência infecção aguda com ampla variedade de gravidade clínica. O animal doente costuma manifestar sinais clínicos bastante evidentes e são transmissores ineficientes para outros animais (HIRSH e ZEE, 2003; QUINN et al., 2005).

A maioria das infecções nos suínos tem a forma subclínica. Dois grupos de suínos são mais suscetíveis a manifestar a infecção clínica: os leitões jovens e as fêmeas prenhes. Hemorragias e septicemia com icterícia ocorrem com maior frequência em animais jovens, enquanto problemas reprodutivos como, aborto e infertilidade são as manifestações nos suínos adultos (HIRSH e ZEE, 2003; ZIMMERMAN et al., 2012).

No entanto, dependendo do sorotipo causador da doença, as manifestações clínicas e patológicas podem variar de infecções moderadas dos sistemas urinário e genital a doença sistêmica séria (QUINN et al., 2005). A infecção associada ao sorotipo Bratislava é caracterizada por baixa resposta sorológica, rápida transmissão de animal para animal, sinais clínicos leves resultantes de infecção transplacentária e prolongado estado de portador renal. Este sorotipo tem sido isolado de fetos abortados, leitões natimortos, fracos leitões recém-nascidos, rins e trato reprodutivo de porcas e varrões de rebanhos apresentando falhas reprodutivas (AZEVEDO et al., 2008).

O isolamento da bactéria de fetos abortados, natimortos e leitões fracos foi obtido em diversas ocasiões, entretanto, a bactéria nunca havia sido isolada de leitões aparentemente saudáveis nascidos de matrizes com infecção subclínica. Soto et al. (2006), uma semana após o parto, colheram amostras de fígado, rins, pulmões, coração, baço e conteúdo gástrico de leitões nascidos de matrizes infectadas experimentalmente com o sorotipo Canicola para realização de exame através da PCR. Após a inoculação, todas as matrizes infectadas apresentaram no teste de SAM anticorpos anti-leptospira. Contudo, a PCR não detectou a presença de leptospiras na urina, e somente em uma matriz pesquisada apresentou resultado positivo nas amostras dos rins e fígado. Dos leitões clinicamente saudáveis pesquisados, 83,3% apresentaram resultados positivos na PCR em pelo menos umas das amostras testadas, confirmando a transmissão vertical da infecção e o risco de infecção em manter um animal com doença subclínica no rebanho.

Quando a doença é causada pelos sorotipos Icterohaemorrhagiae e Copenhageni, ambos adaptados aos roedores, a leptospirose suína aparece de forma aguda e algumas vezes fatal em suínos jovens (QUINN et al., 2005). Infecções com os sorotipos Grippotyphosa ou Icterohaemorrhagiae podem causar doença severa e estão associados a altos títulos de anticorpos e a um curto período de portador renal (ZIMMERMAN et al., 2012).

A leptospirose na fase aguda geralmente coincide com o período de bacteremia. Nessa fase da infecção, muitos suínos apresentam como sinais clínicos: anorexia transitória, pirexia e apatia. Na doença crônica, os sinais clínicos primários mais comumente relatados em rebanhos doentes são: aborto, infertilidade, nascimento de leitões fracos ou natimortos, alta mortalidade pré-desmame e nefrite intersticial crônica. As maiores perdas econômicas da suinocultura são justificadas por falhas reprodutivas consequentes da leptospirose crônica (BOLIN et al., 1991; BOLIN, 1994; QUINN et al., 2005).

Azevedo et al. (2008) evidenciaram a influência negativa da soro-positividade no desempenho reprodutivo de matrizes soropositivas quando comparadas com as fêmeas soronegativas. As matrizes soropositivas apresentaram um tempo prolongado entre o intervalo de desmame-cio, diminuição do número de leitões nascidos, diminuição do número de leitões desmamados, baixo escore corporal dos leitões no nascimento e aumento de natimortos. Dos animais soropositivos, o sorotipo mais encontrado foi o Bratislava.

Ainda como característica da doença crônica, Hashimoto et al. (2008) e Miraglia et al. (2008) verificaram uma significativa associação entre a nefrite intersticial e a soro-positividade para a leptospirose em suínos aparentemente saudáveis abatidos nos estados do Paraná e São Paulo. Em contrapartida, Oliveira et al., (2012) não detectaram através da Imunofluorescência Direta a presença da *Leptospira* spp. em nenhum dos 400 rins condenados por nefrite em frigoríficos do Mato Grosso.

Outras causas de nefrite intersticial em suínos incluem agentes bacterianos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. Entretanto, as lesões causadas por esses organismos são extremamente leves e não são associadas com as lesões macroscópicas descritas como *white spots* (BAKER et al., 1989).

As lesões conhecidas como *white spots* consistem em pequenos focos acinzentados difusos no córtex renal, geralmente cercados por um anel hiperêmico. Microscopicamente são lesões de nefrite intersticial progressiva com presença de atrofia glomerular, espessamento discreto da cápsula de Bowman e infiltrado mononuclear com necrose do epitélio tubular (ZIMMERMAN et al., 2012; FIGUEIREDO et al., 2013).

Com o intuito de comprovar a associação das lesões *white spots* à leptospirose em bovinos, Azizi et al. (2012) coletaram amostras de rins apresentando lesões focais

ou multifocais juntamente com amostras de urina e sangue para a realização da PCR utilizando como alvo o gene *lipL32*. O DNA da bactéria foi detectado em mais de 50% dos rins coletados de vacas com lesão característica de *white spots* e nefrite intersticial, sugerindo que a bactéria está associada às tais lesões renais.

Diagnóstico

Ao longo dos anos, mesmo com todos os avanços da Medicina Veterinária e da Biologia Molecular, diagnosticar a leptospirose suína ainda é considerado um desafio. O diagnóstico da leptospirose é feito correlacionando os informes clínicos e epidemiológicos com os resultados laboratoriais encontrados. O diagnóstico pode ser realizado por diferentes métodos laboratoriais de detecção direta ou indireta do agente ou de seu material genético (BOLIN, 1994, HIRSH e ZEE, 2003). Entretanto, a falta de um teste laboratorial ideal para a detecção da leptospirose continua sendo a maior barreira para o diagnóstico e vigilância da doença (HARTSKEERL, COLLARES-PEREIRA e ELLIS, 2011).

Métodos de Diagnóstico Direto

Microscopia

A *Leptospira* spp. tem dimensões bastante reduzidas e dificilmente é visualizada pelos métodos de coloração tradicionais como Gram ou Giemsa. O princípio da Microscopia de Campo Escuro (MCE) é baseado nos reflexos da superfície do microorganismo ampliado pelo microscópio. Nesse caso, quando as lentes estão focadas nas leptospiras, as bactérias são vistas como objetos brilhosos em um fundo escuro contrastante (FAINE e STALMAN, 1982; HIRSH e ZEE, 2003).

As leptospiras no sangue podem ser detectadas apenas durante os primeiros dias depois do início da infecção. Aproximadamente 10^4 mL de leptospiras são necessários para uma célula por campo ser visível pela técnica da MCE. A desvantagem de utilizar a MCE como ferramenta de diagnóstico tem sido a facilidade em gerar falso-negativos e falso-positivos, mesmo quando funcionários qualificados fazem a leitura da lâmina (AHMAD, SHAH e AHMAD, 2005).

Além disso, o resultado da leitura também pode ser influenciado pelo momento da infecção em que a amostra foi coletada e pelo tempo entre a coleta e a análise de seu

conteúdo, sendo ideal a utilização de esfregaços frescos para realizar a pesquisa do organismo. Por esses e outros erros de classificação, esse método não deve ser utilizado como um teste de laboratório definitivo, e sim como um complemento a outros métodos de diagnóstico (TOYOKAWA, OHNISHI e KOIZUMI, 2011).

Métodos de coloração têm sido aplicados a fim de aumentar a sensibilidade do exame de microscopia direta de amostras do sangue, urina e outros tecidos de animais suspeitos. Os métodos são: o método de Coloração por Prata Warthin-Starry (WS); o método de Imunofluorescência Direta (IF); e o método de Imunohistoquímica (IHQ) (AHMAD, SHAH e AHMAD, 2005). As técnicas de WS e IF permitem a visualização direta de toda a bactéria, o que representa a principal vantagem desses métodos. A IF é especialmente útil para a detecção de antígenos da membrana externa da bactéria (FORNAZARI et al. 2012).

As limitações da IF são a falta de informação sobre a morfologia do tecido afetado, a dificuldade em preservar os resultados e a necessidade de um equipamento especial de microscopia fluorescente. Em contraste, a IHQ não necessita de um microscópio especial e proporciona a oportunidade de examinar a distribuição e a localização do agente no fragmento de tecido pesquisado. Além disso, esse é o único método que permite estudos retrospectivos utilizando amostras de tecidos fixados por formalina e embebidos por parafina. Contudo, a IHQ é uma técnica com baixa sensibilidade para diagnosticar a leptospirose e não permite a determinação do sorotipo infectante (BOLIN, 1994).

Cultura Bacteriológica

O isolamento da bactéria é considerado o padrão ouro de diagnóstico, apesar disso, o método é dificultado pela necessidade de imediata inoculação pós-coleta em meios de cultura específicos e pelo demorado índice de crescimento do organismo (LEVETT, 2001; ADLER e PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

As leptospiras podem ser isoladas de amostras clínicas de sangue, líquido cérebro-espinhal, urina e tecidos coletados *post mortem*. As amostras teciduais devem ser maceradas antes da inoculação em meio líquido. Os meios de cultura mais utilizados são: meio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH), meio Korthof modificado

ou meio semissólido Fletcher (TORTEN e MARSHALL, 1994; ZIMMERMAN et al., 2012).

O meio inoculado deve ser mantido a uma temperatura de 28 a 30 °C e verificado semanalmente através da MCE até completar 20 semanas de inoculado, quando pode vir a ser descartado caso apresente resultado negativo. Portanto, a cultura bacteriana não é considerada efetiva como um teste diagnóstico de rotina, sendo utilizada principalmente em pesquisas. Apesar da alta especificidade, esse teste tem baixa sensibilidade e pode demorar muitos meses até a liberação de um resultado negativo (AHMAD, SHAH e AHMAD, 2005). Contudo, o isolamento da bactéria tem um importante significado na investigação epidemiológica, sendo pré-requisito para a identificação de cepas envolvidas na infecção em determinadas áreas geográficas (ZIMMERMAN et al., 2012).

Métodos de Diagnóstico Indireto

Métodos sorológicos vêm sendo utilizados ao longo dos anos comprovando a resposta imunológica do hospedeiro ao entrar em contato com a bactéria. Dependendo do método aplicado, os anticorpos podem ser detectados no sangue em aproximadamente 10 dias pós-infecção (LEVETT, 2001). Nesse momento, devido à baixa probabilidade da detecção das leptospiros no sangue, os métodos sorológicos são necessários. Na realidade, até mesmo durante a fase de leptospiúria, quando a eliminação dos organismos pode ser intermitente, os métodos de diagnóstico direto podem ser inconclusivos (ADLER e PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

Teste da Soroaglutinação Microscópica (SAM)

O diagnóstico indireto através da demonstração de anticorpos anti-leptospira pela técnica SAM é o método mais frequentemente utilizado e o teste sorológico recomendado para o diagnóstico da leptospirose humana e animal (HIRSH e ZEE, 2003; WHO, 2010; OIE 2012; ZIMMERMAN et al., 2012). O teste é comumente utilizado devido ao seu baixo custo, ser largamente disponível e ter sensibilidade razoável (BOLIN, 1994). A base do teste é a detecção de reações de aglutinação entre o soro contendo anticorpos com os antígenos de membrana externa de leptospiros vivos. A aglutinação depende primariamente da presença de anticorpos específicos contra o

lipopolissacarídeo (LPS) presente na membrana externa da bactéria. Depois da incubação, a mistura do soro-antígeno é analisada através da MCE a fim de avaliar a porcentagem de aglutinação e determinar a titulação sorológica (LEVETT, 2003).

Infecções causadas pelos sorotipos Pomona, Grippotyphosa ou Icterohaemorrhagiae são geralmente diagnosticadas utilizando métodos sorológicos devido aos altos títulos de anticorpos produzidos em suínos infectados. Diagnosticar a infecção causada pelo sorotipo Bratislava é mais difícil por causa da baixa resposta sorológica dos suínos infectados e também pelo fato da presença dos organismos infectantes ser rara nos tecidos do animal (AZEVEDO et al., 2008). Títulos no SAM variam consideravelmente e podem ser mantidos por até 3 semanas, seguido de subsequente declínio gradual. Títulos baixos podem ser detectáveis por vários anos em muitos animais (ZIMMERMAN et al., 2012).

Apesar de ser amplamente utilizado e recomendado, o SAM tem importantes limitações. Um banco de sorotipos deve ser mantido vivo e em meio líquido, o que requer repetidas análises semanais e subcultura de um grande número de cepas, apresentando perigo para os funcionários do laboratório. No mínimo, para não ocorrerem resultados falso-negativos, o banco deve incluir todos os sorotipos circulantes da localidade. A técnica de SAM é trabalhosa e demanda pessoal treinado e experiente para minimizar a probabilidade de erros. Além disso, a leitura dos resultados é subjetiva, podendo variar de acordo com o laboratório executor (BHARTI et al., 2003; AHMAD, SHAH e AHMAD, 2005; OIE, 2012).

Tratando-se da habilidade de identificar o sorotipo infectante, existe um consenso em que o SAM pode identificar confiavelmente o presumível sorogrupo. Porém, devido ao alto grau de reação cruzada entre os diferentes sorotipos em cada sorogrupo, o teste não pode ser considerado sorotipo-específico (AHMAD, SHAH e AHMAD, 2005). O teste detecta anticorpos das classes M e G, e não pode diferenciar entre infecção atual, recente ou antiga, ou até mesmo diferenciar anticorpos consequentes de infecção natural ou em resposta à vacinação. Desta forma, é importante considerar o histórico de vacinação dos animais submetidos ao teste (OIE, 2012).

Depois de 45 a 60 dias da vacinação, os títulos de anticorpos contra diversos sorotipos encontrados na vacina podem persistir em um nível de 100 ou mais. Em contraste, títulos consequentes da infecção natural dos sorotipos, exceto o Bratislava,

tendem a ser iguais ou maiores do que 800. Porcos infectados com o sorotipo Bratislava apresentam baixos títulos de anticorpos (de 50 a 200) ou, caso títulos mais altos apareçam, os mesmos rapidamente baixam para menores níveis. Isso torna difícil distinguir os títulos resultantes de infecção natural daqueles resultantes da vacinação (BOLIN, 1994; OIE, 2012).

Quando suínas prenhes são expostas às leptospiras, há geralmente um atraso entre o tempo de infecção e o aborto. Logo, os títulos de anticorpos devem alcançar o auge antes do aborto e análises de amostras do soro em fase aguda e de convalescência podem mostrar títulos estáveis ou em diminuição. Amostras de soro coletadas de leitões anteriormente o fornecimento do colostro podem conter anticorpos anti-leptospira caso a infecção transplacentária tenha ocorrido. Esses anticorpos estão presentes em títulos baixos (menores do que 100), mas geralmente são específicos contra o sorotipo infectante (BOLIN, 1994).

ELISA – Ensaio Imunoenzimático

Diante das várias limitações do SAM, e da complexidade de suas interpretações, vários testes para detectar imunoglobulinas anti-leptospira tem sido desenvolvidos com o propósito de substituí-lo ou complementá-lo. O teste de ELISA foi desenvolvido para humanos e animais, suas vantagens são: a habilidade de distinguir a infecção aguda da crônica através da detecção de imunoglobulinas específicas IgM ou IgG (eventualmente IgA), a alta sensibilidade e especificidade, e a alta repetitividade quando comparado com o teste de SAM (OIE, 2012). Por outro lado, dependendo do antígeno usado, um resultado positivo no teste de ELISA não dá nenhuma indicação quanto ao sorogrupo/sorotipo infectante e não é suficiente para diagnosticar um caso de leptospirose, o que deve ser confirmado através da técnica da PCR ou através de cultura bacteriológica (PICARDEAU, 2013).

O desenvolvimento de apenas um reagente antigênico específico adequado para a detecção sorológica de infecções causadas por todos os sorotipos ainda permanece como um grande desafio. Estão disponíveis kits de ELISA baseados na detecção de anticorpos contra as leptospiras, geralmente contra a cepa saprófita *L. biflexa* ou a cepa intermediária *L. fainei*, as quais dividem com as cepas patogênicas diversos antígenos de superfície (PICARDEAU, 2013).

A LipL32 é a principal proteína estudada como um antígeno para os protocolos de ELISA usados em diferentes animais. Este é o antígeno mais abundante encontrado no perfil total das leptospiros, altamente conservado entre as espécies patogênicas e ausente nas espécies saprófitas. A lipoproteína de superfície LipL32 também foi identificada como um alvo do sistema imunológico durante infecção natural por leptospiros. A sensibilidade e a especificidade dos resultados encontrados nos protocolos de ELISA utilizando a proteína LipL32 como antígeno recombinante são encorajadores. Quando comparado com o SAM, estudos em suínos utilizando o método ELISA apresentam sensibilidade de 100% e especificidade de 85,1% (HARTLEBEN et al., 2013).

Métodos Avançados de Diagnóstico Direto

Diagnóstico Molecular

O uso da PCR para amplificação do DNA é uma excelente ferramenta diagnóstica para a detecção da *Leptospira* spp. em tecidos e líquidos animais (HIRSH e ZEE, 2003). O diagnóstico molecular está sendo utilizado com maior frequência e vem se destacando em relação às técnicas sorológicas por atender aos requisitos de sensibilidade, especificidade e rápida detecção dos patógenos (SANTOS et al., 2011). A importância dessa técnica está relacionada à detecção do animal portador dentro de um rebanho, e até mesmo ao diagnóstico precoce de um animal acometido pela forma mais severa da leptospirose (HAMOND et al., 2012b).

Ademais, a técnica da PCR é bastante útil para o diagnóstico de organismos fastidiosos ou com o crescimento lento, e pode ser facilmente utilizada em laboratórios não especializados, diferentemente do SAM, o qual tem alto custo e necessita de laboratório especial para sua execução (CÉSPEDES et al., 2007).

Apesar de ter algumas limitações como, por exemplo, a incapacidade de identificar o sorotipo infectante, a técnica permite que a amplificação do DNA do microrganismo seja feita mesmo quando o mesmo está em concentrações mínimas e em variados tecidos biológicos. Alguns sistemas moleculares são sensíveis o bastante a ponto de detectar de 10 a 100 cópias do genoma da bactéria por mL (AHMAD, SHAH e AHMAD, 2005; BOURHY et al., 2011).

A técnica da PCR se divide em duas categorias baseadas na detecção de genes que estão universalmente presentes na bactéria, como o gene 16S rRNA ou *rrs*, o gene *gyrB* e o gene *secY*, ou na detecção de genes restritos às bactérias patogênicas, como o gene *lipL32*, o *ligA* e o *ligB*, sendo os últimos mais efetivos em diagnósticos precoces da doença (PALANIAPPAN et al., 2005; SLACK et al., 2006; AHMED et al., 2009; HAMOND et al., 2012b; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2014).

Tratamento, Controle e Prevenção

A leptospirose pode ser definida como uma doença causada por qualquer um dos mais de 300 sorotipos conhecidos. Cada sorotipo é capaz de infectar quase todos os mamíferos existentes, podendo transformar qualquer hospedeiro em um portador renal ativo de leptospirosas virulentas. Além disso, qualquer sorotipo é capaz de trocar de hospedeiro principal (*shift*) podendo simultaneamente perder ou ganhar virulência. Por causa das razões mencionadas, a prevenção absoluta, ou a erradicação completa da leptospirose é impossível (TORTEN e MARSHALL, 1994).

Como tratamento indica-se a antibioticoterapia. As leptospirosas são sensíveis a diversos antibióticos, como: penicilina, fluorquinolonas, tetraciclina, cloranfenicol, estreptomicina e eritromicina. Para um tratamento benéfico, o mesmo deve ser instituído precocemente ou como forma profilática em casos de exposição ao agente (HIRSH e ZEE, 2003). Contudo, a ação isolada de antibióticos não será suficiente para eliminar ou controlar a infecção de rebanhos (ZIMMERMAN et al., 2012).

Um dos fatores críticos do controle da leptospirose suína é a interrupção da transmissão da doença pelo suíno ou hospedeiro portador renal do agente, para tal algumas ações devem ser associadas: antibioticoterapia, despovoamento por meio de vazio sanitário, limpeza e desinfecção de instalações ou granjas suínicas, imunização de suscetíveis e rigoroso controle de roedores (HIRSH e ZEE, 2003; CARPENTER, SCORGIE e JOSEPHSON, 2006).

As vacinas disponíveis atualmente têm baixa eficácia, imunidade limitada e são sorotipo-específica, exigindo no mínimo reforço anual (LEVETT, 2001; HIRSH e ZEE, 2003). No Brasil, a imunização dos animais susceptíveis é feita utilizando vacinas anti-leptospirose constituídas de bactérias íntegras inativadas polivalentes. Os sorotipos

comumente presentes na vacina são: Canicola, Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Pomona, Grippotyphosa e Bratislava (KOIZUMI e WATANABE, 2005).

Por ser baseada no determinante lipopolissacarídeo apenas dos seis sorotipos envolvidos em sua produção, a vacina confere pouca proteção cruzada contra os outros sorotipos infectantes. Além disso, o alto custo de sua produção e a necessidade de realizar reforços ao longo dos anos aumentam as limitações da vacina (KAUFMANN et al., 1999). Ainda assim, a vacinação é bastante utilizada a fim de reduzir a prevalência da infecção no rebanho, diminuindo as taxas de abortamento e de mortalidades fetal (HIRSH e ZEE, 2003; ZIMMERMAN et al., 2012).

O contato dos suínos com prováveis portadores renais da bactéria deve ser evitado ou controlado, principalmente tratando-se de roedores, os principais reservatórios naturais da bactéria. O controle do hospedeiro mais importante em uma zona endêmica reduz drasticamente a chance de contato com o agente, assim como o número de casos clínicos de humanos e animais domésticos (TORTEN e MARSHALL, 1994; ZIMMERMAN et al., 2012).

Outra importante ação é controlar a entrada e saída de animais domésticos solicitando os documentos necessários para transações interestaduais e internacionais e, desta forma, certificar a ausência da doença. Apesar da erradicação absoluta da leptospirose ser uma tarefa impossível, a prevenção e a prática de métodos de controle adequados pode reduzir bastante a incidência dessa doença em humanos e animais domésticos (TORTEN e MARSHALL, 1994).

OBJETIVO

O objetivo desse trabalho foi detectar através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) a presença do gene *lipL32* em fragmentos coletados de rins de suínos abatidos em frigoríficos localizados no Distrito Federal com o intuito de estudar a ocorrência do agente e identificar animais portadores renais na região. Todos os frigoríficos visitados estavam sob a inspeção sanitária de Fiscais Agropecuários da Diretoria de Inspeção de Produtos de Origem Vegetal e Animal/Secretaria de Agricultura e Desenvolvimento Rural do Distrito Federal - DIPOVA/SEAGRI/GDF.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABPA, Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual – 2015**. Brasil: p. 102-161.
- ADLER, B.; PEÑA MOCTEZUMA, A. de la, *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 27, n. 3-4, p. 287-296, 2010.
- AGUDELO-FLÓREZ, P.; LONDOÑO, A. F.; QUIROZ, V. H.; ÁNGEL, J. C.; MORENO, N.; LOAIZA, E. T.; MUÑOZ, L. F.; RODAS, J. D. Prevalence of *Leptospira* spp. in Urban Rodents from a Groceries Trade Center of Medellín, Colombia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.**, v. 85, n. 5, p. 906-910, 2009.
- AHMAD, S. N.; SHAH, S.; AHMAD, F. M. Laboratory diagnosis of leptospirosis. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 51, n. 3, p. 195-200, 2005.
- AHMED, A.; ENGELBERTS, M. F.; BOER, K. R.; AHMED, N.; HARTSKEERL, R. A. Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic leptospira species in clinical materials. **PLoS One**, v. 18, n. 9, p. 01-08, 2009.
- ARANGO, J.; CITTADINO, E.; AGOSTINI, A.; MAZZONELLI, G. D.; ALVAREZ, C.; COLUSI, M.; KOVAL, A.; BRITOS, A. C.; KRAVETZ, F. Prevalencia de leptospiras en *Rattus rattus* y *Rattus norvegicus* en el Gran Buenos aires, Argentina. **Ecología Austral**, v. 11, p. 25-30, 2001.
- AZEVEDO, S. S.; SOTO, F. R. M.; MORAIS, Z. M.; PINHEIRO, R. S.; BATISTA, C. S. A.; VUADEN, E.; VASCONCELLOS, S. A. The effects of the leptospiral infection on reproductive performance in sows. **Veterinarski Arhiv**, v. 78, n. 1, p. 13-21, 2008.
- AZIZI, S.; TAJBAKSH, E.; HAJIMIRZAEI, M. R.; VARNAMKHAJASTI, M. G.; SADEGHIAN, H.; ORYAN, A. Evaluation of ‘white-spotted kidneys’ associated with leptospirosis by polymerase chain reaction based *LipL32* gene in slaughtered cows. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 83, n. 1, p. 01-05, 2012.

BAKER, T. F.; MCEWEN, S. A.; PRESCOTT, J. F.; MEEK, A. H. The Prevalence of Leptospirosis and its Association with Multifocal Interstitial Nephritis in Swine at Slaughter. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 53, p. 290-294, 1989.

BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICALDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; LEVETT, P. N.; GILMAN, R. H.; WILLIG, M. R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. M. Leptospirosis a zoonotic disease of global importance. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 12, p. 757-771, 2003.

BOLIN, C. A. Diagnosis of leptospirosis in swine. **Swine Health and Production**, v. 2, n. 3, p. 23-24, 1994.

BOLIN, C. A.; CASSELLS, J. A.; HILL, H. T.; FRANTZ, J. C.; NIELSEN, J. N. Reproductive failure associated with *Leptospira interrogans* serovar Bratislava infection of swine. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 3, p. 152-154, 1991.

BOURHY, P.; BREMONT, S.; ZININI, F.; GIRY, C.; PICARDEAU, M. Comparison of Real-Time PCR Assays for Detection of Pathogenic *Leptospira* spp. in Blood and Identification of Variations in Target Sequences. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 6, p. 2153-2160, 2011.

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, n. 12, p. 5528-5536, 2009.

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

BROWN, J. A.; LEFEBVRE, R. B.; PAN, M. J.; Protein and Antigen Profiles of Prevalent Serovars of *Leptospira interrogans*. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 5, p. 1772-1777, 1991.

BULACH, D. M.; ZUERNER, R. L.; WILSON, P.; SEEMANN, T.; MACGRATH, A.; CULLEN, A. P.; DAVIS, J.; JOHNSON, M.; KUCZEK, E.; ALT, D. P.; PETERSON-BURCH, B.; COPPEL, R. L.; ROOD, J. I.; DAVIES, J. K.; ADLER, B. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential.

Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 103, n. 39, p. 14560-14565, 2006.

BUNNELL, J. E.; HICE, C. L.; WATTS, D. M.; MONTRUEIL, V.; TESH, R. B.; VINETZ, J. M. Detection of pathogenic *Leptospira spp.* Infections among mammals captured in the Peruvian amazon basin region. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 63, n. 5, p. 255-258, 2000.

CARPENTER, J. A.; SCORGIE, A.; JOSEPHSON, G. *Leptospira interrogans* serovar Pomona infection associated with carcass condemnation of swine at slaughter. **Journal of Swine Health and Production**, v. 14, n. 3, p. 145-148, 2006.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. **Etymologia: *Leptospira***. **Emerg Infect Dis**. Estados Unidos, 2013. Disponível em:

<<http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/19/3/et-1903>> Acesso em 25/11/2015.

CÉSPEDES, M.; TAPIA, R.; BALDA, L.; GONZALEZ, D.; PERALTA, C.; CONDORI, P. Standardization and validation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of human leptospirosis. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, v. 24, p. 20-26, 2007.

CIAS, Central de Inteligência de Aves e Suínos da EMBRAPA Suínos e Aves A **Suinocultura no Brasil**. Santa Catarina, 2010. Disponível em:

<http://www.cnpsa.embrapa.br/cias/index.php?option=com_content&view=article&id=5:origem-dos-suinis&catid=4:suinis-publico&Itemid=19> Acesso em: 08 fevereiro 2014.

COSSON, J. F.; PICARDEAU, M.; MIELCAREK, M.; TATARD, C.; CHAVAL, Y.; SUPUTTAMONGKOL, Y.; BUCHY, P.; JITTAPALAPONG, S.; HERBRETEAU, V. MORAND, S. Epidemiology of *Leptospira* Transmitted by Rodents in Southeast Asia. **PLoS Medicine**, v. 8, n. 6, p. 01-10, 2014.

COSTA, F.; RIBEIRO, G.; FELZEMBURGH, R. D. M.; SANTOS, N.; REIS, R. B.; SANTOS, A. C.; FRAGA, D. B. M.; ARAUJO, W. N.; SANTANA, C.; CHILDS, J. E.; REIS, M. G.; KO, A. I. Influence of Household Rat Infestation on *Leptospira* Transmission in the Urban Slum Environment. **PLoS Medicine**, v. 8, n. 12, p. 01-08, 2014.

DELBEM, A. C. B.; FREIRE, R. L.; SILVA, C. A.; MULLER, E. E.; DIAS, R. A.; NETO, J. S. F.; FREITAS, J. C. Fatores de risco associados à soro-positividade para leptospirose em matrizes suínas. **Ciência Rural**, v. 34, n. 3, p. 847-852, 2004.

FAINE, S.; STALLMAN, N. D. Amended Descriptions of the Genus *Leptospira* Noguchi 1917 and the Species *L. interrogans* (Stimson 1907) Wenyon 1926 and *L. biflexa* (Wolbach and Binger 1914) Noguchi 1918. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 32, n. 4, p. 461-463, 1982.

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. **Acta Tropica**, v. 108, p. 01-05, 2008.

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, eqüinos, suínos e cães de diversos estados brasileiros. **Ciência Rural**, v. 32, n. 4, p. 613-619, 2002.

FERNANDES, F. C.; WILDNER, S. M.; FURLANETTO, A. L. Possíveis Infecções Ocupacionais em Tratadores de Suínos. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 35, n. 3, p. 15-26, 2006.

FIGUEIREDO, I. L.; HIGINO, S. S. S.; ALVES, C. J.; DEL FAVA, C.; CARRETERO, M. E.; AZEVEDO, S. S. Inter-relação entre frequência de anticorpos anti-*leptospira* spp. e exames histopatológicos (hematoxilina-eosina e Warthin-Starry) em suínos abatidos no semiárido Paraibano. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, n. 1, p. 27-34, 2013.

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**, v. 90, n. 3, p. 321-326, 2012.

GANOZA, C. A.; MATTHIAS, M. A.; COLLINS-RICHARDS, D.; BROUWER, K. C.; CUNNINGHAM, C. B.; SEGURA, E. R.; GILMAN, R. H.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. M. Determining Risk for Severe Leptospirosis by Molecular Analysis of Environmental Surface Waters for Pathogenic *Leptospira*. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 8, p. 1329-1340, 2006.

HAAKE, D. A.; CHAO, G.; ZUERNER, R. L.; BARNETT, J. K.; BARNETT, D.; MAZEL, M.; MATSUNAGA, J.; LEVETT, P. N.; BOLIN, C. A. The Leptospiral Major Outer Membrane Protein LipL32 Is a Lipoprotein Expressed during Mammalian Infection. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 4, p. 2276-2285, 2000.

HAAKE, D. A.; MARTINICH, C.; SUMMERS, T. A.; SHANG, E. S.; PRUETZ, J. D.; MCCOY, A. M.; MAZEL, M. K.; BOLIN, C. Characterization of Leptospiral Outer Membrane Lipoprotein LipL36: Downregulation Associated with Late-Log-Phase Growth and Mammalian Infection. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 4, p. 1579-1587, 1998.

HAMOND, C.; MARTINS, G.; LILENBAUM, W.; MEDEIROS, M.A. PCR detection of leptospiral carriers among seronegative horses. **Veterinary Record**. v.171, n. 4, p. 105-106, 2012b.

HAMOND, C.; MARTINS, G.; LOUREIRO, A. P.; BREMONT, S.; MEDEIROS, M. A.; BOURHY, P.; LILENBAUM, W. First isolation and characterization of *Leptospira interrogans* sorogruppo Australis from swine in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 1, p. 6-8, 2015.

HARTLEBEN, C. P.; LEAL, F. M.; MONTE, L. G.; HARTWIG, D. D.; SEIXAS, F. K.; VASCONCELLOS, S. A.; BRIHUEGA, B.; DELLAGOSTIN, O. A. Serological analysis by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant antigen LipL32 for

the diagnosis of swine leptospirosis. **Current Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 106-109, 2013.

HARTSKEERL, P. A.; TERPSTRA, W. J. Leptospirosis in wild animals. **Veterinary Quarterly**, v. 18, n. 3, p. 149-150, 1996.

HARTSKEERL, R. A.; COLLARES-PEREIRA, M. ELLIS, W. A. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, p. 494-501, 2011.

HASHIMOTO, V. Y.; ANZAI, E. K.; LIMA, B. A. C.; SILVA, F. G.; ALVES, L. A.; FREIRE, R. L.; TELES, P. S.; GARCIA, J. L.; MULLER, E. E.; FREITAS, J. C. Associação entre as lesões renais microscópicas e a presença de anticorpos contra *Leptospira* spp. em suínos aparentemente sadios abatidos em frigorífico da região norte do estado do Paraná. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 4, p. 875-880, 2008.

HENRY, R. A.; JOHNSON, R. C. Distribution of the Genus *Leptospira* in Soil and Water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 492-499, 1978.

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, P.; GOMEZ, A. R.; BAQUERO, M.; QUINTERO, G. Identification of *ompL1* and *lipL32* Genes to diagnosis of Pathogenic *Leptospira* spp. Isolated from Cattle. **Open Journal of Veterinary Medicine**, v. 4, p. 102-112, 2014.

HIRSH, C. D.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara Koogan S.A., p. 174-178, 2003.

HOOKEY, J. V.; BRYDEN, J.; GATEHOUSE, L. The use of 16S rDNA sequence analysis to investigate the phylogeny of *Leptospiraceae* and related spirochaetes. **Journal of General Microbiology**, v. 139, p. 2585-2590, 1993.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores IBGE – Estatística da Produção Pecuária**. Brasil: p. 12-16, 2015.

INADA, R.; IDO, Y.; HOKI, R.; KANEKO, R.; ITO, H. The Etiology, mode of infection, and specific therapy of Weil's Disease (*Spirochaetosis icterohaemorrhagica*). **Journal of Experimental Medicine**, v. 23, n. 3, p. 377-402, 1916.

IVANOVA, S.; HERBRETEAU, V.; BLASDELL, K.; CHAVAL, Y.; BUCHY, P.; GUILLARD, B.; MORAND, S. *Leptospira* and Rodents in Cambodia: Environmental Determinants of Infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.**, v. 86, n. 6, p. 1032-1038, 2012.

KAUFMANN, A. F.; SULZER, K. R.; STEIGERWALT, A. G.; ROGERS, F. C.; BRENNER, D. J. ***Leptospira* Molecular Genetic Server**. Paris, França, 1999.
Disponível em: <<http://www.pasteur.fr/recherche/Leptospira/Strains.html>> Acesso em: 20 novembro 2015.

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

JOHNSON, R. C.; HARRIS, V. G.; WALBY, J. K. Characterization of Leptospire according to Fatty Acid Requirements. **Journal of General Microbiology**, v. 55, p. 399-407, 1969.

KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospirosis vaccines: Past, present, and future. **Journal of Postgraduate Medicine**, v.51, n. 3, p. 210-214, 2005.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 296-326, 2001.

LEVETT, P. N. Usefulness of Serologic Analysis as a Predictor of the Infecting Serovar in Patients with Severe Leptospirosis. **Clinical Infectious Diseases.**, v. 36, n. 4 p. 447-452, 2003.

LEVETT, P. N.; MOREY, R. E.; GALLOWAY, R.; STEIGERWALT, A. G. ELLIS, W. A. Reclassification of *Leptospira parva* Hovind-Hougen *et al.* 1982 as *Turneriella parva* gen. nov., comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 1497-1499, 2005.

LOUREIRO, A. P.; MARTINS, G.; THOMÉ, S.; LILENBAUM, W. Laboratorial diagnosis of animal leptospirosis. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 20, n. 3, p. 119-126, 2013.

LPSN, List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. **Genus *Leptospira***. França, 2015. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/leptospira.html>> Acesso em 06 novembro 2015.

MATTHIAS, M. A.; RICALDI, J. N.; CÉSPEDES, M.; DIAZ, M. M.; GALLOWAY, R. L.; SAITO, M.; STELGERWALT, A. G.; PATRA, K. P.; ORE, C. V.; GOTUZZO, E.; GILMAN, R. H.; LEVETT, P. N.; VINETZ, J. M. Human Leptospirosis Caused by a New, Antigenically Unique *Leptospira* Associated with a *Rattus* Species Reservoir in the Peruvian Amazon. **PLoS Medicine**, v. 2, n. 4, p. 01-12, 2008.

MAYER-SCHOLL, A.; HAMMERL, J. A.; SCHMIDT, S.; ULRICH, R. G; PFEFFER, M.; WOLL, D.; SCHOLZ, H. C.; THOMAS, A.; NOCKLER, K. *Leptospira* spp. in Rodents and Shews in Germany. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 11, p. 7562-7574, 2014.

MILAS, Z.; MAJETIC, Z. A.; HABUS, J.; PERKO, V. M.; STARESINA, V.; BARBIC, L.; STEVANOVIC, V.; PERHARIC, M.; LJUBIC, B.; TURK, N. The occurrence and maintenance of *Leptospira* serovars Australis and Bratislava in domestic and wild animals in Croatia. **Veterinarski arhiv**, v. 83, n. 4, p. 357-359, 2013.

MILLER, D. A.; WILSON, M. A.; OWEN, W. J.; BERAN, G. W. Porcine leptospirosis in Iowa. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, n. 2, p. 171-175, 1990.

MIRAGLIA, F.; MORENO, M. A.; GOMES, C. R.; PAIXÃO, R.; LIUSON, E.; MORAIS, Z. M.; MAIORKA, P.; SEIXAS, F. K.; DELLAGOSTIN, O. A.; VASCONCELLOS, S. A. Isolation and characterization of *Leptospira interrogans* from pigs slaughtered in São Paulo state, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 501-507, 2008.

MONAHAN, A. M.; CALLANAN, J. J.; NALLY, J. E. Proteomic Analysis of *Leptospira interrogans* Shed in Urine of Chronically Infected Hosts. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 11, p. 4952-4958, 2008.

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

NALLY, J. E.; CHOW, E.; FISHBEIN, M. C.; BLANCO, D. R.; LOVETT, M. A. Changes in Lipopolysaccharide O Antigen Distinguish Acute versus Chronic *Leptospira interrogans* Infection. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 6, p. 3251-3260, 2005.

NALLY, J. E.; WHITELEGGE, J. P.; BASSILIAN, S.; BLANCO, D. R.; LOVETT, M. A. Characterization of the Outer Membrane Proteome of *Leptospira interrogans* Expressed during Acute Lethal Infection. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 2, p. 766-773, 2007.

NOGUCHI, H. *Spirochaeta icterohaemorrhagiae* in American wild rats and its relation to the Japanese and European strains. **Journal of Experimental Medicine**, v. 25, n. 5, p. 755-763, 1917.

OLIVEIRA, J. X. F.; PAULA, D. A. J. de; MORÉS, N.; PESCADOR, C. A.; CIACCIZANELLA, J. R.; COLDEBELLA, A.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L. Interstitial nephritis of slaughtered pigs in the State of Mato Grosso, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 4, p. 313-318, 2012.

OLIVEIRA, S. J. de; BORTOLANZA, F.; PASSOS, D. T.; SIMÕES PIRES-NETO, J. A.; FALLAVENA, L. C. B.; WEIMER, T. A. Molecular diagnosis of *Leptospira* spp. in culled sows. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 44, n. 1, p. 18-23, 2007.

OIE, World Organisation for Animal Health. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**, 6^a ed. World Organisation for Animal Health, Paris, 2012.

OSAVA, C. F.; SALABERRY, S. R. S.; NASCIMENTO, C. C. N.; LIMA-RIBEIRO, A. M. C.; MOREIRA, R. Q.; CASTRO, J. R.; RIGO, V. H. B. Ocorrência de Anticorpos anti-leptospira spp. em diferentes sistemas de criação de suínos. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 2, p. 202-207, 2010.

- PALANIAPPAN, R. U.; CHANG, Y. F.; CHANG, C. F.; PAN, M. J.; YANG, C. W.; HARPENDING, P.; MCDONOUGH, S. P.; DUBOVI, E.; DIVERS, T.; QU, J.; ROE, B. Evaluation of lig-based conventional and real-time PCR for the detection of pathogenic leptospire. **Molecular and Cellular Probes**, v. 19, n. 2, p. 111-117, 2005.
- PASTER, B. J.; DEWHIRST, F. E.; WEISBURG, W. G.; TORDOFF, L. A.; FRASER, G. J.; HESPELL, R. B.; STANTON, T. B.; ZABLEN, L.; MANDELCO, L.; WOESE, C. R.. Phylogenetic analysis of the Spirochetes. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 19, p. 6101-6109, 1991.
- PASTERNAK, J. Biofilmes: um inimigo (in)visível. **Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação**, p. 36-38, 2009.
- PICARDEAU, M.; BULACH, D. M.; BOUCHIER, C.; ZUERNER, R. L.; ZIDANE, N.; WILSON, P. J.; CRENO, S.; KUCZEK, E. S.; BOMMEZZADRI, S.; DAVIS, J. C.; MCGRATH, A.; JOHNSON, M. J.; BOURSAUX-EUDE, C.; SEEMANN, T.; ROUY, Z.; COPPEL, R. L.; ROOD, J. I.; LAJUS, A.; DAVIES, J. K.; MÉDIGUE, C.; ADLER, B. Genome Sequence of the Saprophyte *Leptospira biflexa* Provides Insights into the Evolution of *Leptospira* and the Pathogenesis of Leptospirosis. **PLoS one**, v. 3, n. 2, p. 1-9, 2008.
- PICARDEAU, M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 43, n. 1, p. 01-09, 2013.
- QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infeciosas**. Rio Grande do Sul. Ed. Artmed Editora S.A., p. 179-182, 2005.
- RAUBER-JUNIOR, L. E.; CAVALER, A. C.; ARAUJO-JUNIOR, G. V.; LEIRIA, S. V.; ZAMPIERI, T. M.; MERLINI, L. S.; MARTINS, L. A. Soro-prevalência de leptospirose suína na região noroeste do Paraná. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 14, n. 1, p. 33-35, 2011.
- REN, S.; FU, G.; JIANG, X.; ZENG, R.; MIAO, Y.; XU, H.; ZHANG, Y.; XIONG, H.; LU, G.; LU, L.; JIANG, H.; JIA, J; TU, Y.; JIANG, J; GU, W.; ZHANG, Y.; CAI, Z.;

SHENG, H.; YIN, H.; ZHANG, Y.; ZHU, G.; WAN, M.; HUANG, H.; QIAN, Z.; WANG, S.; MA, W.; YAO, Z.; SHEN, Y.; QIANG, B.; XIA, Q.; GUO, X.; DANCHIN, A.; GIRONS, I. S.; SOMERVILLE, R. L.; WEN, Y.; SHI, M.; CHEN, Z.; XU, J.; ZHAO, G. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. **Nature**, v. 422, n. 6934, p. 888-893, 2003.

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

SAITO, M.; VILLANUEVA, S. Y. A. M.; KAWAMURA, Y.; IIDA, K.; TOMIDA, J.; KANEMARY, T.; KOHNO, E.; MIYAHARA, S.; UMEDA, A.; AMAKO, K.; GLORIANI, N. G.; YOSHIDA, S. *Leptospira idonii* sp. nov., isolated from environmental water. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 2457-2462, 2013.

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

SANTOS, T. N.; CARVALHO, F. S.; BEZERRA, R. A.; WENCESLAU, A. A.; ALBUQUERQUE, G. R.; COSTA-DIAS, R. Diagnóstico Molecular de Leptospirose em suínos abatidos clandestinamente no município de Itabuna, BA. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 33, n. 4, p. 195-199, 2011.

SCHWARZ-LINEK, U.; HOOK, M.; POTTS, J. R. The molecular basis of fibronectin-mediated bacterial adherence to host cells. **Molecular Microbiology**, v. 52, v. 3, p. 631-641, 2004.

SHENBERG, E. Growth of Pathogenic *Leptospira* in Chemically Defined Media. **Journal of Bacteriology**, v. 93, n. 5, p. 1598-1606, 1967.

- SINGH, R.; STINE, O. C.; SMITH, D. L.; SPITZNAGEL, J. K.; LABIB, M. E.; WILLIAMS, H. N. Diversity of Biofilms in Dental Unit Water Systems. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 3412-3420, 2003.
- SLACK, A. T.; SYMONDS, M. L.; DOHNT, M. F.; SMYTHE, L. D. Identification of pathogenic *Leptospira* species by conventional or real-time PCR and sequencing of the DNA gyrase subunit B encoding gene. **BioMed Central**, v. 95, n.6, p. 01-10, 2006.
- 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, p. 1859-1862, 2013.
- SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.; MORES, N.; CARVALHO, L.F.; OLIVEIRA, S. **Clínica e patologia suína**. 2.ed. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, p. 464, 1999.
- SOTO, F. R. M.; AZEVEDO, S. S. de; MORAIS, Z. M. de; PINHEIRO, S. R.; DELBEM, Á. C. B.; MORENO, A. M.; PAIXÃO, R.; VAUDEN, E. R.; VASCONCELLOS, S. A. Detection of leptospire in clinically healthy piglets born from sows experimentally infected with *Leptospira interrogans* sorovar Canicola. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 582-586, 2006.
- SUGUNAN, A. P.; VIJAYACHARI, S.; SHARMA, S.; ROY, S.; MANICKAM, P.; NATARAJASEENIVASAN, K.; GUPTA, M. D.; SEHGAL, S. C. Risk factors associated with leptospirosis during an outbreak in Middle Andaman, India. **Indian Journal of Medical Research**, v. 130, n 1, p. 67-73, 2009.
- TORTEN, M.; MARSHALL, R. B. **Handbook of Zoonoses**. 2 ed. Boca Raton, Florida. Ed. CRC Press, p. 245-264, 1994.
- TOYOKAWA, T.; OHNISHI, M.; KOIZUMI, N. Diagnosis of acute leptospirosis. **Expert Review of Anti-infective Therapy**. v. 9, n. 1, p. 111-121, 2011.
- TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. 4 ed. São Paulo. Ed. Atheneu, p. 405-407, 2005.

TRUEBA, G.; ZAPATA, S.; MADRID, K.; CULLER, P.; HAAKE, D. Cell aggregation a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. **International Microbiology**, v. 7, p. 35-40, 2004.

TRUONG, Q. L.; SEO, T. W.; YOON, B. I.; KIM, H. C.; HAN, J. H.; HAHN, T. W. Prevalence of Swine Viral and Bacterial Pathogens in rodents and Stray Cats Captured around Pig Farms in Korea. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 75, n. 12, p. 1647-1650, 2013.

TURK, N.; MILAS, Z.; MARGALETIC, J.; STARESINA, V. SLAVICA, A.; RIQUELME-SERTOUR, N.; BELLENGER, E.; BARANTON, G.; POSTIC, D. Molecular characterization of *Leptospira* spp. strains isolated from small rodents in Croatia. **Epidemiology Infection**, v. 130, p. 159-166, 2003.

WASINSKI, B. Infections of swine caused by *Leptospira* serovars of serogroup Sejroe – possibilities of recognition with the use of PCR. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 58, p. 521-526, 2014.

WASINSKI, B.; Occurrence of *Leptospira* sp. antibodies in swine in Poland. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 51, p. 225-228, 2007.

WHO, World Health Organization. **Report of the first meeting of leptospirosis burden epidemiology reference group**. Geneva: p. 01-34, 2010.

WOESE, C. R. Bacterial Evolution. **Microbiological Reviews**, v. 51, n. 2, p. 221-271, 1987.

WOLBACH, S. B.; BINGER, C. A. L. Notes on a filterable spirochete from fresh water. **Journal of Medicine Research**, v. 30, n. 1, p. 23-26 , 1914.

YASUDA, P. H.; STEIGERWALT, A. G.; SULZER, K. R.; KAUFMANN, A. F.; ROGERS, F.; BRENNER, D. J. Deoxyribonucleic Acid Relatedness between Serogroups and Serovars in the Family *Leptospiraceae* with Proposals for Seven New *Leptospira* Species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, n. 4, p. 407-415, 1987.

ZIMMERMAN, J. J.; KARRIKER, L. A.; RAMIREZ, A.; SCHWARTZ, K. J.; STEVENSON, G. W. **Diseases of Swine**. 10 ed. Inglaterra, Chichester. Ed. John Wiley & Sons, Inc., p. 769-772, 2012.

ZUERNER, R. L. Physical map of chromosomal and plasmid DNA comprising the genome of *Leptospira interrogans*. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 18, p. 4857-4860, 1991.

ZUERNER, R. L.; HERRMANN, J. L.; GIRON, I. S. Comparison of Genetic Maps for Two *Leptospira interrogans* Serovars Provides Evidence for Two Chromosomes and Intraspecies Heterogeneity. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 17, p. 5445-5451, 1993.

CAPÍTULO II

Pesquisa de *Leptospira* spp. em rins de suínos abatidos em frigoríficos do DF por PCR

Research of *Leptospira* spp. in pig kidneys slaughtered in the DF by PCR

Marcela Lobo Tokatjian^{1*}; Simone Perecmanis²

¹ Mestrado em Saúde Animal, Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília (UnB), Brasília – DF.

* Correspondência para: marcelalobo1@gmail.com

² Professor adjunto III da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília (UnB), Brasília – DF

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo detectar através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) a presença do fragmento do gene *lipL32* em fragmentos coletados de rins de suínos abatidos em frigoríficos localizados no Distrito Federal com o intuito de estudar a ocorrência da *Leptospira* spp., assim como identificar suínos portadores renais do agente. Foram coletadas amostras renais de 50 carcaças provenientes de animais oriundos de três propriedades diferentes. A PCR foi baseada na detecção do fragmento do gene *lipL32*, o qual é extremamente conservado em todas as cepas patogênicas da *Leptospira* spp. O resultado encontrado em todas as amostras do estudo foi negativo para a bactéria *Leptospira* spp. Em granjas com boas condições sanitárias, apesar de o risco de transmissão ser baixo, a leptospirose suína permanece como um assunto preocupante tanto para a Saúde Animal quanto para a Saúde Pública.

Palavras-chave: suíno, *Leptospira*, proteína LipL32, PCR, zoonose

ABSTRACT

This study aimed to detect through the Polymerase Chain Reaction (PCR) the presence of *lipL32* gene in fragments collected from pig kidneys in slaughterhouses

located in Distrito Federal in order to study the occurrence of the *Leptospira* spp. as well as identify renal carriers of the agent. Kidney samples from 50 animals from three different properties were collected. The PCR method was based on the detection of *lipL32* gene which is highly conserved in all strains of pathogenic *Leptospira* spp. The PCR was negative in all the surveyed kidney samples. In farms with good sanitary conditions, despite the low risk of transmission, swine leptospirosis remains a matter of concern both for Animal Health and for Public Health.

Key words: pig, *Leptospira*, lipL32 protein, PCR, zoonosis

INTRODUÇÃO

A suinocultura no Brasil vem se qualificando como uma das atividades responsáveis pela manutenção do desenvolvimento econômico e social de muitos municípios e estados do país, gerando empregos no campo, na indústria e no comércio. No terceiro trimestre do ano de 2015 o abate de suínos no Brasil foi recorde e apresentou o maior resultado desde 1997. A região Sul é responsável pela maioria dos abates (66,6%), seguida pelas regiões Sudeste (18,2%), Centro-Oeste (14%), Nordeste (1,1%) e Norte (0,1%) (IBGE, 2015). No cenário internacional, o Brasil segue como o quarto maior produtor e o quarto maior exportador de carne suína (ABPA, 2015).

Listada como uma doença de notificação obrigatória pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), a leptospirose é uma das principais doenças infecciosas dos suínos (OIE, 2012). Além de interferir com os índices produtivos da suinocultura, a leptospirose é considerada uma zoonose amplamente disseminada pelo mundo, afetando diversas espécies de animais domésticos e silvestres, representando riscos para a saúde pública (Azevedo et al, 2008; Osava et al., 2010).

A Leptospirose é uma doença bacteriana causada por espiroquetas patogênicas pertencentes ao gênero *Leptospira*. A membrana externa das leptospirosas é composta por um perfil de proteínas bastante complexo. De acordo com Haake et al. (2000), a proteína mais proeminente encontrada na membrana externa das leptospirosas tem massa molecular de aproximadamente 32 kDa e é denominada como LipL32. A proteína LipL32 é expressa em altos níveis não somente durante o cultivo bacteriano, mas também durante a infecção de mamíferos, sendo sua sequência e expressão altamente conservadas entre os sorotipos patogênicos.

A epidemiologia da leptospirose suína é complexa, uma vez que os suínos podem ser infectados por qualquer um dos sorotipos patogênicos. Na espécie suína, os sorotipos mais comumente encontrados, infectando e causando a doença, são: Bratislava, Icterohaemorrhagiae, Canicola, Gryppotyphosa, Tarassovi, Muenchen e Pomona (Azevedo et al., 2008; Osava et al., 2010; Zimmerman et al., 2012).

A transmissão da doença ocorre por mecanismos diretos e indiretos. Sabe-se que o microrganismo é mais efetivamente transmitido por contato direto do animal doente ou portador renal com o animal sadio, porém, quando as condições ambientais são favoráveis, a transmissão indireta também pode ocorrer. Uma das principais formas de manter a doença nos rebanhos é através dos suínos portadores renais, os hospedeiros de manutenção. Esses animais são pouco afetados pela doença, mas por albergarem a bactéria patogênica em seus túbulos renais e a eliminarem na urina. Possuem fundamental importância na transmissão indireta da enfermidade para suínos suscetíveis, assim como na infecção de outros animais e humanos (Adler e Peña Moctezuma, 2010; Zimmerman et al., 2012).

Em animais suscetíveis, duas situações distintas podem resultar em consequência da infecção por *Leptospira* spp., a forma aguda e a forma crônica. A leptospirose na fase aguda geralmente coincide com o período de bacteremia da doença. Nessa fase da infecção, muitos suínos apresentam como sinais clínicos: anorexia transitória, piroxia e apatia (Bolin et al., 1991).

Na doença crônica, os sinais clínicos mais comumente relatados em rebanhos doentes estão relacionados principalmente às falhas reprodutivas: aborto, infertilidade, mumificação fetal, nascimento de leitões fracos ou natimortos, alta mortalidade pré-desmame e nefrite intersticial crônica (Santos et al., 2011). As maiores perdas econômicas da suinocultura são justificadas por falhas reprodutivas consequentes da leptospirose crônica (Bolin, 1994; Azevedo et al., 2008).

O objetivo desse trabalho foi detectar através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) a presença do fragmento do gene *lipL32* em fragmentos coletados de rins de suínos abatidos em frigoríficos localizados no Distrito Federal com o intuito de estudar a ocorrência do agente e identificar animais portadores renais na região.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletados rins de 50 suínos procedentes de três propriedades diferentes abatidos em abatedouros frigoríficos sob a inspeção sanitária de Fiscais Agropecuários da DIPOVA/SEAGRI/GDF no Estado do Distrito Federal durante o mês de maio de 2015. Da propriedade número 1 foram coletadas amostras renais de 20 carcaças, da propriedade número 2 também foram coletadas amostras renais de 20 carcaças e da propriedade número 3 foram coletadas amostras renais de 10 carcaças. A escolha dos animais foi aleatória, sem discriminação de sexo, raça e idade. Na inspeção *ante-mortem* e *post-mortem*, nenhum dos animais apresentava sinais clínicos ou lesões macroscópicas compatíveis com a leptospirose.

Para a coleta das amostras foi utilizado material estéril: luvas de látex, pinças e lâminas de bisturi. A fim de evitar a contaminação cruzada entre os animais amostrados realizou-se uso individual do material de coleta. Fragmentos com tamanho aproximado de 2 a 3 cm, abrangendo tanto a região medular quanto a cortical, foram coletados de ambos os rins dos suínos estudados. As amostras de cada suíno foram acondicionadas em potes coletores estéreis e mantidas em bolsa térmica com gelo durante o trajeto até o laboratório de Microbiologia Veterinária do Hospital Veterinário da UnB, onde as amostras foram armazenadas a temperatura de - 20 °C em refrigerador específico.

Para obter amostras homogêneas e ao mesmo tempo preservar suas condições originais, os fragmentos coletados foram processados sem adição de nenhuma substância no *Stomacher* do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da UnB. Em seguida, para a extração de DNA, retirou-se 10 µL de cada amostra homogênea e utilizou-se o kit de extração *PureLink® Genomic DNA Kits (Mammalian Tissue and Mouse/Rat Tail Lysate)* da Invitrogen®.

Tabela 1. Sequência de oligonucleotídeos e o tamanho dos amplicons utilizados nas ampliações

<i>Primer</i>	Sequência de oligonucleotídeos	Tamanho do amplicon (bp)
<i>lipL32 F</i>	5' CGC TTG TGG TGC TTT CGG TGGT 3'	264 bp
<i>lipL32 R</i>	5' CTC ACC GAT TTC GCC TGT TGG G 3'	264 bp

A amplificação foi realizada de acordo com Jouglard et al. (2006). Foram utilizados *primers* específicos baseados no gene *lipL32* (Tab. 1). A PCR foi baseada na

detecção da sequência 264 bp do gene *lipL32*, a qual é extremamente conservada em todas as cepas patogênicas da *Leptospira* spp. (Haake et al., 2000). A reação foi realizada com volume final de 25 µL dos seguintes reagentes: 3 µL da amostra, 0,5 µL *Taq* Phoneutria[®], 1 µL de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 2,5 µL de solução tampão, 0,75 µL MgCl₂, 1 µL de dNTP, 15,25 µL de Água Millie Q.

O *mix* preparado foi acondicionado ao termociclador Techgene da Techne[®] sob as condições de: 94 °C por 5 minutos seguido de 32 ciclos a 94 °C por 1 minuto, 72 C° por 1 minuto, e a final extensão de 72 C° por 7 minutos. Foi adicionado 2 µL de marcador às alíquotas de 10 µL das amostras amplificadas. Depois de homogeneizada, esta solução foi submetida à eletroforese horizontal em gel de agarose 2% e corrida a 60 voltz. Após a corrida o gel foi corado com solução de brometo de etídeo (5 mg/mL) por 20 minutos e a visualização das bandas foi feita através do transiluminador ultravioleta (UVP[®]).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amplificação do gene *lipL32* foi negativa em todas as amostras renais pesquisadas. Desde o início dos anos 90 o diagnóstico molecular está sendo utilizado com maior frequência e vem se destacando em relação às técnicas sorológicas por atender aos requisitos de sensibilidade, especificidade e rápida detecção dos patógenos em diferentes materiais pesquisados (urina, sangue, tecido renal e líquido cérebro-espinhal) (Mérien et al., 1992; Mayer-Scholl et al, 2011; Santos et al., 2011). A detecção da *Leptospira* spp. patogênica em fluidos corporais ou tecidos de animais é muito importante para o diagnóstico da leptospirose por fornecer evidências incontestáveis de infecção ativa ou do estado de animal portador renal do agente (Mérien et al., 1992).

O gene *lipL32* é a proteína de membrana externa mais abundantemente encontrada na superfície de todos os sorotipos patogênicos e ausente em espécies saprófitas. Com o objetivo de desenvolver um teste de PCR específico para sorotipos patogênicos, o gene *lipL32* foi utilizado como alvo (Jouglard et al., 2006).

É importante ressaltar que o curso natural da doença influencia diretamente em qual teste diagnóstico deve ser escolhido juntamente com qual o tipo de amostra deve ser coletada (Picardeau, 2013). Durante a leptospirose (fase aguda e inicial da doença),

o agente pode ser facilmente detectado em amostras de sangue total, fluido cérebro-espinal e em outros fluidos do animal. Nessa fase da doença a resposta humoral ainda não está estabelecida e geralmente os animais não apresentam títulos sorológicos detectáveis em testes sorológicos convencionais. Nesse caso, um método direto como, por exemplo, a PCR, é geralmente mais apropriado do que o uso de métodos sorológicos. Desta forma o diagnóstico definitivo pode ser feito anteriormente à detecção de anticorpos, quando o tratamento dos animais é mais eficiente (Hamond et al., 2012b).

No presente estudo, o tecido renal foi a amostra de escolha para a detecção da bactéria *Leptospira* spp. em razão do organismo se albergar e se multiplicar nos rins de mamíferos hospedeiros acidentais ou nos rins de hospedeiros de manutenção, os indesejados portadores renais (Zimmerman et al, 2012).

Considerando que a correta execução da inspeção *ante mortem* e *post mortem* impedirá o abate de animais enfermos com manifestação de sinais clínicos de doenças infecciosas como, por exemplo, a leptospirose suína, a utilização de amostras coletadas de abatedouro não representa uma amostragem adequada para o estudo da prevalência da leptospirose suína em uma determinada região, permitindo apenas uma noção geral de sua ocorrência, assim como o conhecimento da presença de suínos portadores renais (Shimabukuro et al., 2003; Carrijo et al., 2012).

As infecções por *Leptospira* spp. ocorrem em frequências importantes nos rebanhos de suínos brasileiros, podendo variar em relação à constância de acordo com o sistema de produção, manejo, clima, região e sorotipo infectante (Azevedo et al., 2008; Osava et al., 2010; Zimmerman et al., 2012).

Miraglia et al. (2008), pesquisaram fêmeas suínas abatidas no estado de São Paulo e isolaram quatro estirpes dos animais que apresentavam títulos no teste de soroprecipitação microscópica (SAM) para o sorotipo Pomona. A presença de DNA bacteriano foi confirmada através da técnica da PCR, sendo que a maioria dos resultados positivos foi oriunda de testes em amostras renais. Contudo, a técnica da PCR falhou em detectar a presença da *Leptospira* spp. em mais de um órgão do mesmo animal, e isso pode ser justificado pelo momento da infecção do animal pesquisado. Ainda assim, foi possível correlacionar os resultados positivos obtidos com a cultura bacteriológica e com a técnica da PCR, sendo a última a mais sensível.

No Estado do Paraná, Filippsen et al. (2001) pesquisaram rebanhos de suínos criados ao ar livre na região Sudoeste e relataram sorologia negativa para leptospirose. Delbem et al. (2004), pesquisando animais no mesmo estado, encontraram maior prevalência do sorotipo *Icterohaemorrhagiae* nas matrizes soropositivas testadas. Ainda no Paraná, porém na região Noroeste, Rauber-Junior et al. (2011) detectaram o sorotipo Hardjo como o mais prevalente em suínos soropositivos para a leptospirose.

Osava et al. (2010), ao estudarem três sistemas de criação diferentes, encontraram o sorotipo *Icterohaemorrhagiae* com maior frequência, seguido do sorotipo Hardjo. Os pesquisadores verificaram a ocorrência de anticorpos anti-leptospira em suínos procedentes de três diferentes sistemas produtivos: granja não tecnificada, granja tecnificada e granja que utiliza o sistema intensivo de suínos criados ao ar livre (SISCAL) localizadas nos municípios de Rio Verde (GO), Uberlândia e Uberaba (MG). Encontraram prevalência de anticorpos anti-leptospira nos três sistemas de criação, sendo a maior frequência na granja tecnificada.

Na Bahia, Santos et al. (2011) analisaram através da PCR a presença de DNA da *Leptospira interrogans* no sangue de suínos abatidos clandestinamente. Das 72 amostras coletadas, 14 (19,44%) foram positivas e apresentaram fragmentos de DNA compatíveis com os encontrados em cepas patogênicas de leptospirose. Ainda na região do nordeste Brasileiro, Figueiredo et al. (2013) realizaram a prova de soro-aglutinação microscópica em 126 suínos abatidos no semiárido Paraibano a fim de determinar a frequência de anticorpos anti-leptospira. De todos os animais testados, 18 (14,6%) foram positivos, com predominância do sorotipo Autumnalis.

Gonçalves et al. (2011) estudaram diferentes sistemas de criação suína (extensiva e confinamento) no Piauí. Quando comparados, o sistema de criação extensiva apresentou maior suscetibilidade em relação à predisposição para a infecção por *Leptospira* spp., sendo o sorotipo *Icterohaemorrhagiae* o mais encontrado nos animais soropositivos. Dois perfis sorológicos distintos podem ser encontrados em rebanhos infectados endemicamente. Em suínos criados em criações intensivas e infectados com as cepas adaptadas aos suínos, a prevalência de títulos de anticorpos é bem baixa. Acredita-se que isso seja resultado de uma infecção primariamente causada por transmissão venérea. Em contraste, suínos mantidos em criações extensivas

apresentaram soro-prevalência bem maior e a justificativa seria a infecção adquirida através do contato com a urina de roedores portadores (Zimmerman et al., 2012).

Também no Nordeste brasileiro, em estudo da ocorrência de anticorpos anti-leptospira em 305 suínos abatidos no agreste do Estado de Pernambuco, Cavalcanti (2011) demonstrou através da técnica de SAM 78 animais positivos, sendo que os sorotipos mais frequentes foram Icterohaemorrhagiae (55,12%), Copenhageni (17,94%) e Djasiman (6,41%).

Em Santa Catarina, ainda na região Sul do país, Carrijo et al. (2012) pesquisaram através da técnica de Imunofluorescência Direta a presença da bactéria em rins de 100 suínos de diferentes propriedades abatidos sob inspeção sanitária e não encontraram nenhuma amostra positiva para a bactéria *Leptospira* spp.

No estado de Goiás, estudando a prevalência da *L. interrogans* em reprodutores suínos, Souza (2000) identificou como os sorotipos mais importantes: Icterohaemorrhagiae, Bratislava, Grippytyphosa, Djasiman, Autumnalis, Pomona, Hardjo, Tarassovi, Pyogenes, Canicola e Australis. No entanto, em estudo mais recente no mesmo estado, a fim de analisar o perfil sanitário de 170 suínos de criações extensivas, Barthasson (2005) realizou a técnica da SAM contra 11 sorotipos de leptospiros (Icterohaemorrhagiae, Bratislava, Grippytyphosa, Autumnalis, Pomona, Hardjo, Tarassovi, Canicola, Ballum e Wolffi), não demonstrando em seus resultados a presença de anticorpos contra nenhum dos sorotipos testados.

Em estudo retrospectivo de exames sorológicos realizados em suínos com suspeita clínica em amostras coletadas no período 1983 a 1987, Favero et al. (2002) identificaram predominantemente os sorotipos Grippytyphoosa e Icterohaemorrhagiae em Minas Gerais; Pomona no Rio Grande do Sul; Pomona e Icterohaemorrhagiae em Pernambuco e Rio de Janeiro; Autumnalis no Ceará; e Icteroaheamorrhagiae em Goiás, Paraná, Santa Catarina e São Paulo.

No estado de São Paulo, a presença de suínos portadores renais foi estudada por Shimabukuro et al. (2003) por meio da pesquisa do agente em amostras sanguíneas e renais de 131 animais através de cultura bacteriológica, PCR e por meio da demonstração de anticorpos anti-leptospira pela técnica da SAM. Como resultado, os autores obtiveram pela SAM 48 amostras sorológicas positivas para um ou mais sorotipos de *Leptospira* spp., sendo o sorotipo Icterohaemorrhagiae o de maior

importância. Na pesquisa do agente nos rins, 88 amostras foram submetidas à cultura em meio de Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) e analisadas pela técnica da PCR. Apesar de 48 animais terem apresentado resultados positivos na sorologia, apenas em uma única amostra renal de um animal soropositivo foi possível isolar (cultura) e detectar o agente (PCR).

Um dos fatores críticos do controle da leptospirose suína é a interrupção da transmissão da doença pelo suíno ou outro hospedeiro mamífero portador renal. Em vista disso, a importância da técnica da PCR está relacionada à detecção rápida e prática do animal portador dentro de um rebanho, diferenciando o mesmo de um animal doente ou vacinado, o que o teste de SAM falha em realizar (Bolin, 1994; Shimabukuro et al., 2003; Mayer-Scholl et al, 2011; Hamond et al., 2012b).

A técnica de SAM, apesar de ser o método mais utilizado e o teste sorológico recomendado para o diagnóstico da leptospirose humana e animal, apresenta limitações relevantes. Uma das maiores limitações do teste é a necessidade de um enorme banco de sorotipos disponível para a realização dos exames. Na ausência de algum sorotipo importante na região estudada, os resultados da sorologia podem não estar acurados, podendo surgir falso-negativos (WHO, 2010; OIE 2012; Zimmerman et al., 2012).

O mesmo problema não acontece em relação à técnica da PCR. Uma vez que ao utilizar como alvo o gene *lipL32* é possível detectar *Leptospira* spp. em amostras clínicas independente do sorotipo patogênico infectante, gerando resultados mais confiáveis (Jouglard et al., 2006; Mayer-Scholl et al., 2011). Ademais, por apresentar alta especificidade e sensibilidade a técnica permite que a amplificação do DNA do microrganismo seja feita mesmo quando o mesmo está em concentrações mínimas e em variados tecidos biológicos (Bourhy et al., 2011).

Além disso, resultados positivos apenas no teste de SAM não podem ser conclusivos em relação à presença de infecção ativa, ou de animal portador renal, necessitando ser complementado por outros métodos de diagnósticos para o isolamento ou detecção do agente, como por exemplo, a técnica da PCR (OIE, 2012).

Ainda assim, mesmo quando os animais apresentam altos títulos anti-leptospira nos testes sorológicos, a não detecção do agente em amostras renais através da técnica da PCR pode acontecer. Esse evento ocorre em algumas situações: quando os animais testados foram infectados, apresentando ou não a doença, e rapidamente eliminaram o

agente e o estado de portador renal; quando os altos títulos sorológicos resultam de uma resposta vacinal e não de uma infecção natural; e, por fim, quando a infecção é recente e ainda não houve colonização renal (Shimabukuro et al., 2003; OIE, 2012; Zimmerman et al., 2012).

A condição sanitária de uma granja suinícola pode estar relacionada às práticas de manejo e de saneamento adotadas, conferindo o controle da leptospirose por meio de uma série de medidas preventivas (Osava et al., 2010; OIE, 2012). Todas as amostras coletadas neste trabalho foram provenientes de animais sadios oriundos de granjas com boas condições sanitárias. Complementarmente, todos os animais foram submetidos à inspeção sanitária nos estabelecimentos de abate.

CONCLUSÕES

O resultado encontrado em todas as amostras do estudo foi negativo para a bactéria *Leptospira* spp. Apesar de o risco de transmissão da bactéria ser baixo, a leptospirose suína permanece como um assunto preocupante tanto para a Saúde Animal quanto para a Saúde Pública. Sendo necessários outros estudos a fim de entender melhor a epidemiologia da doença na região do Distrito Federal.

APROVAÇÃO POR COMITÊ DE ÉTICA

Esse trabalho foi avaliado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília, tendo sido aprovado sob número de UnBDOC nº 43582/2014.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABPA, Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual – 2015**. Brasil: p. 102-161.

ADLER, B.; PEÑA MOCTEZUMA, A. de la, *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 27, n. 3-4, p. 287-296, 2010.

AZEVEDO, S. S.; SOTO, F. R. M.; MORAIS, Z. M. et al. The effects of the leptospiral infection on reproductive performance in sows. **Veterinarski Arhiv**, v. 78, n. 1, p. 13-21, 2008.

BARTHASSON, D. L. **Perfil sanitário de suínos de criações extensivas do Estado de Goiás**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás. Escola de Veterinária, Goiânia, Goiás, 91p, 2005.

BOLIN, C. A. Diagnosis of leptospirosis in swine. **Swine Health and Production**, v. 2, n. 3, p. 23-24, 1994.

BOLIN, C. A.; CASSELLS, J. A.; HILL, H. T. et al. Reproductive failure associated with *Leptospira interrogans* serovar Bratislava infection of swine. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 3, p. 152-154, 1991.

BOURHY, P.; BREMONT, S.; ZININI, F. et al. Comparison of Real-Time PCR Assays for Detection of Pathogenic *Leptospira* spp. in Blood and Identification of Variations in Target Sequences. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 6, p. 2153-2160, 2011.

CARRIJO, K. F.; NASCIMENTO, E. R.; MORÉS, N. et al. *Leptospira* spp. em rins de suínos abatidos sob inspeção sanitária: potencial risco de transmissão a trabalhadores de matadouro frigorífico. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 34, n. 4, p. 279-282, 2012.

CAVALCANTI, E. F. T. S. F. **Pesquisa de *Toxoplasma gondii* e Anticorpos Anti-*Leptospira* spp. em suínos abatidos no Agreste do Estado de Pernambuco, Brasil**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Medicina Veterinária, Recife, Pernambuco, 84p, 2011.

DELBEM, A. C. B.; FREIRE, R. L.; SILVA, C. A. et al. Fatores de risco associados à soropositividade para leptospirose em matrizes suínas. **Ciência Rural**, v. 34, n. 3, p. 847-852, 2004.

FAVERO, A. C. M.; PINHEIRO, S. R.; VASCONCELLOS, S. A. et al. Sorovares de leptospirosas predominantes em exames sorológicos de bubalinos, ovinos, caprinos, eqüinos, suínos e cães de diversos estados brasileiros. **Ciência Rural**, v. 32, n. 4, p. 613-619, 2002.

FIGUEIREDO, I. L.; HIGINO, S. S. S.; ALVES, C. J. et al. Inter-relação entre frequência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. e exames histopatológicos (hematoxilina-eosina e Warthin-Starry) em suínos abatidos no semiárido Paraibano. **Arquivos do Instituto Biológico.**, v. 80, n. 1, p. 27-34, 2013.

FILIPPSSEN, L. F.; LEITE, D. M. G.; SILVA, A.; VARGAS, G. A. Prevalência de Doenças Infecciosas em rebanhos de suínos criados ao ar livre na região sudoeste do Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, v. 31, n. 2, p. 299-302, 2001.

GONÇALVES, L. M. F.; MINEIROS, A. L. B. B.; CARVALHO, S. M. de. et al. Pesquisa de aglutininas, antígeno de leptospiros e apoptose em rim de suínos naturalmente infectados por *Leptospira* spp. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 7, p. 561-568, 2011.

HAAKE, D. A.; CHAO, G.; ZUERNER, R. L. et al. The Leptospiral Major Outer Membrane Protein LipL32 Is a Lipoprotein Expressed during Mammalian Infection. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 4, p. 2276-2285, 2000.

HAMOND, C.; MARTINS, G.; LILENBAUM, W.; MEDEIROS, M.A. PCR detection of leptospiral carriers among seronegative horses. **Veterinary Record**. v.171, n. 4, p. 105-106, 2012b.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores IBGE – Estatística da Produção Pecuária**. Brasil: p. 12-16, 2015.

JOUGLARD, S.D.; SIMIONATTO, S.; SEIXAS, F.K. et al. Nested polymerase chain reaction for detection of pathogenic leptospires. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 747–752, 2006.

MAYER-SCHOLL, A.; DRAEGER, A.; LUGE, E. et al. Comparison of Two PCR Systems for the Rapid Detection of *Leptospira* spp. From Kidney Tissue. **Current Microbiology**, v. 62, p. 1104-1106, 2011.

MÉRIEN, F.; AMOURIAUX, P.; PEROLAT, P. et al. Polymerase Chain Reaction for Detection of *Leptospira* spp. in Clinical Samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 9, p. 2219-2224, 1992.

MIRAGLIA, F.; MORENO, M. A.; GOMES, C. R. et al. Isolation and characterization of *Leptospira interrogans* from pigs slaughtered in São Paulo state, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 501-507, 2008.

OIE, World Organisation for Animal Health. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**, 6^a ed. World Organisation for Animal Health, Paris, 2012.

OSAVA, C. F.; SALABERRY, S. R. S.; NASCIMENTO, C. C. N. et al. Ocorrência de Anticorpos anti-leptospira spp. em diferentes sistemas de criação de suínos. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 2, p. 202-207, 2010.

PICARDEAU, M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 43, n. 1, p. 01-09, 2013.

RAUBER-JUNIOR, L. E.; CAVALER, A. C.; ARAUJO-JUNIOR, G. V. et al. Soroprevalência de leptospirose suína na região noroeste do Paraná. **Arquivos de Ciências Veterinárias e. Zoologia da UNIPAR**, v. 14, n. 1, p. 33-35, 2011.

SANTOS, T. N.; CARVALHO, F. S.; BEZERRA, R. A. et al. Diagnóstico Molecular de Leptospirose em suínos abatidos clandestinamente no município de Itabuna, BA. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 33, n. 4, p. 195-199, 2011.

SHIMABUKURO, F. H.; DOMINGUES, P. F.; LANGONI, H. et al. Pesquisa de suínos portadores renais de leptospiras pelo isolamento microbiano e reação em cadeia pela polimerase em amostras de rins de animais sorologicamente positivos e negativos para leptospirose. **Brazilian journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 243-253, 2003.

SOUZA, A. S. **Estudo da prevalência de *Leptospira interrogans* em reprodutores suínos em produção e aspectos epidemiológicos da infecção em Goiás**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás. Escola de Veterinária, Goiânia, Goiás, 74p, 2000.

WHO, World Health Organization. **Report of the first meeting of leptospirosis burden epidemiology reference group**. Geneva: p. 01-34, 2010.

ZIMMERMAN, J. J.; KARRIKER, L. A.; RAMIREZ, A. et al. **Diseases of Swine**. 10 ed. Inlaterra, Chichester. Ed. John Wiley & Sons, Inc., p. 769-772, 2012.