

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta tese  
será disponibilizado somente a partir  
de 30/11/2020.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E  
SOROEPIDEMIOLÓGICA DA *Leptospira* spp. DE SUÍNOS  
ABATIDOS NO ESTADO DE SÃO PAULO**

**Carla Resende Bastos**

Médica Veterinária

**2018**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E  
SOROEPIDEMIOLÓGICA DA *Leptospira* spp. DE SUÍNOS  
ABATIDOS NO ESTADO DE SÃO PAULO**

**Discente: Carla Resende Bastos**

**Orientador: Prof. Dr. Luis Antonio Mathias**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, Área: Medicina Veterinária Preventiva.

**2018**

B327i

Bastos, Carla Resende

Isolamento, caracterização molecular e soroepidemiológica da *Leptospira* spp. de suínos abatidos no Estado de São Paulo / Carla Resende Bastos. -- Jaboticabal, 2018

144 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Luis Antonio Mathias

1. Espiroqueta. 2. Zoonose. 3. Leptospirose. 4. *Sus scrofa*  
*domesticus*. 5. Epidemiologia. I. Título.

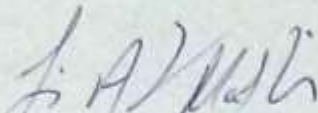
**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

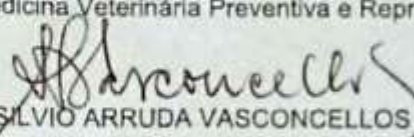
TÍTULO DA TESE: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E SOROEPIDEMIOLÓGICA DA *Leptospira* spp. DE SUÍNOS ABATIDOS NO ESTADO DE SÃO PAULO

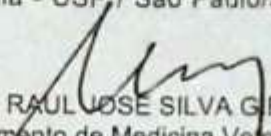
**AUTORA: CARLA RESENDE BASTOS**

**ORIENTADOR: LUÍS ANTONIO MATHIAS**


Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Medicina Veterinária Preventiva pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. LUÍS ANTONIO MATHIAS  
Depto Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

  
Prof. Dr. SILVIO ARRUDA VASCONCELLOS  
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP / São Paulo/SP

  
Prof. Dr. RAUL JOSÉ SILVA GÉRIO  
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

  
Prof. Dra. ANNA MONTEIRO CORREIA LIMA  
Faculdade de Medicina Veterinária / UFU - Uberlândia/MG

  
Prof. Dr. HELIO JOSÉ MONTASSIER  
Microbiologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 30 de novembro de 2018

## **Dados Curriculares do Autor**

**Carla Resende Bastos, Araguari, 05/07/1988** – Filha de Manuel Teixeira Bastos Júnior e Carmen Lúcia Resende Bastos, nascida em 05 de julho de 1988, no município de Araguari/MG. Ingressou em agosto de 2007 no curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Câmpus Umuarama, concluindo em agosto de 2012. Participou do Programa de Educação Tutorial Institucional Medicina Veterinária, no período de novembro de 2008 a dezembro de 2011, desenvolvendo atividades de ensino, pesquisa e extensão. Realizou iniciação científica sobre diarreia neonatal em bezerros e diagnóstico da brucelose no Centro Colaborador de Defesa Agropecuária do Brasil Central, localizado na Universidade Federal de Uberlândia. Cumpriu o estágio curricular na EMBRAPA Suínos e Aves, no setor de sanidade animal, participando da construção da coleção fiel depositária de Microrganismos de Interesse para Suinocultura e Avicultura (CMISEA) no período de fevereiro a junho de 2012. Iniciou o curso de Pós-Graduação Stricto Senso, em março de 2013, obtendo o título de Mestre em Medicina Veterinária, Área de Concentração Medicina Veterinária Preventiva, pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Jaboticabal, São Paulo, em janeiro de 2015, com pesquisa em diagnóstico de brucelose. Em março de 2015, ingressou no curso de doutorado na mesma instituição, desenvolvendo pesquisa dentro da temática leptospirose, e no período de julho a dezembro de 2017 realizou período sanduíche na Louisiana State University – LSU, no laboratório de GeoHealth, na linha de pesquisa: Saúde Geoespacial com aplicações de SIG / Sensoriamento Remoto e Epidemiologia de doenças transmissíveis.

Se cheguei até aqui, foi porque me apoiei no ombro dos gigantes.

Isaac Newton

## **Dedico**

Aos meus pais, Manuel Teixeira Bastos Júnior e Carmen Lúcia Resende Bastos, aos meus irmãos, Fernando Resende Bastos e Jessica Mieko Ota Alves, pelo carinho, apoio e confiança incondicional. Ao meu avô Josef Laurens Lambert Muris (*in memoriam*), por ser meu eterno exemplo.



## AGRADECIMENTOS

Neste momento, agradeço a todos que me deram a força necessária para que eu pudesse atingir meus objetivos.

Agradeço aos meus pais e irmãos por serem sempre fonte de apoio, incentivo e amor incondicional, por terem me dado as condições necessárias para concluir esta etapa e terem compreendido os momentos em que me ausentei durante esses anos.

À minha mãe, Carmen Lúcia Resende Bastos, que sempre me apoiou, incentivou e acreditou em mim quando nem eu mesma acreditava, com seu amor e carinho me impulsiona a ser a cada dia uma pessoa melhor e acreditar que coisas melhores estão por vir. Sua sensibilidade e amor me acalmam e me fazem ver um futuro melhor.

Ao meu pai, Manuel Teixeira Bastos Júnior, de quem herdei o amor pelos animais, que, com sua inteligência e seu esforço, me ajuda e encoraja a buscar o melhor, a crescer e me tornar uma pessoa mais forte. Sua dedicação e cuidado com os animais me inspiram e enchem de orgulho.

Ao meu irmão, Fernando Resende Bastos, que além de irmão é meu melhor amigo e maior incentivador, sempre me animando e cuidando de mim. Dando-me todo apoio para conseguir atingir meus sonhos, sendo meu porto seguro. Junto com a minha cunhada e amiga Isabela Chiguti Yamashita Bastos e sua família, em especial sua mãe Miyuki, e irmã Luna, deram-me um lar e uma família japonesa, repleta de carinho. Obrigada por sempre me darem suporte e estarem presentes nos momentos em que preciso.

À minha irmã, Jéssica Mieko Ota Alves, por estar sempre ao meu lado, me apoiar, escutar, ser companheira e sempre me estender a mão quando preciso. Nem se os laços fossem de sangue, o amor e a cumplicidade seriam tão grandes e sinceros.

Aos meus filhos Tigre, Leopardo e Leão (*in memorian*), e aos meus sobrinhos Luna, Dick e Bolinha (*in memorian*), meus companheiros de estudo, ao meu lado enquanto escrevia a tese, que com simples gestos me fortalecem e incentivam a

querer cada dia me tornar uma pessoa melhor e uma profissional ética, que respeita e ama o que faz. A todos os filhos de quatro patas que tive durante a vida, meu sincero amor.

Ao meu avô Lulu, Josef Laurens Lambert Muris, já falecido, porém meu eterno exemplo de pessoa, cultura, sinceridade e inteligência, no qual me inspiro. Os anos passam, mas minha admiração e amor se mantêm, o homem mais culto e humilde que eu poderia ter o prazer de conhecer.

Ao meu amigo Olavo Sabino Carlos Filho, por ter sido parceiro e acreditado que eu superaria os desafios que foram surgindo durante o doutorado.

Aos amigos de Jaboticabal que levarei para vida: Caren Pavani, Giovanna Serpa Maciel, Higor Oliveira Silva, Mirelle Andréa de Carvalho Picinato, Natasha Gandolfi Miceli, Nathália Cristina Moraes, Renata Ferreira dos Santos e Romeu Moreira dos Santos, cada um de vocês fez a diferença nos meus dias.

A Renata Ferreira dos Santos, “Renatinha”, minha veterana na graduação que ao passar do tempo se tornou uma grande amiga e parceira de pesquisa, que me apoiou em todas as etapas do projeto e da pós-graduação, sempre me incentivando, me animando e sendo exemplo em tudo que faz.

Aos meus amigos do laboratório Imunovir Romeu Moreira dos Santos e Caren Pavani, por todos os momentos de apoio e confraternização repletos de sorvete, por serem ouvintes, conselheiros e amigos sinceros.

A minha amiga Mirelle Andréa de Carvalho Picinato, por todo carinho, ajuda, apoio, longas conversas e sincera amizade. Por ser meu ombro amigo em todos os momentos, alguém com quem posso contar e confiar sempre, além de profissional dedicada e ética.

A Nathália Cristina Moraes, que conheci como residente do departamento, e aos poucos se tornou uma amiga incrível, parceira de projetos, coorientada. Uma amiga especial com quem posso contar e em quem posso confiar em todos os momentos, e por ser meu ponto de apoio em Jaboticabal.

A Giovanna Serpa Maciel e Natasha Gandolfi Miceli, as primeiras amigas que fiz na pós-graduação, que mesmo distantes se fazem tão presentes e importantes.

A Mayara Oliveira, minha amiga de longa data, que, mesmo distante, sabe tudo que se passa, e me incentiva e encoraja, sendo minha confidente e conselheira.

Aos amigos que fiz na LSU, em especial a Michele Inocente, Wellington Ivo Eduardo, Mariana Vitorino, Bruno Nicchio, Moara Martins, Brooke Leibenguth Delcambre, Ryan Avery e Mike the Tiger, por serem minha família em Baton Rouge e fazerem meus dias melhores.

A equipe do Curso de Inverno de Genética, que me possibilitou ultrapassar as barreiras do departamento e trabalhar em conjunto com pós-graduandos e professores de diferentes áreas.

Aos meus amigos e equipe de trabalho Renata Ferreira dos Santos, Higor Oliveira Silva, Romeu Moreira dos Santos, Néstor Darío Franco Marulanda, Nivaldo Aparecido de Assis e Nathália Cristina Moraes, sempre dispostos a ajudar; sem vocês o trabalho não seria possível.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luis Antonio Mathias, exemplo de docente ético e profissional, que me auxiliou durante toda minha trajetória na pós-graduação, sempre mostrando os caminhos para que eu pudesse melhorar. Uma oportunidade constante de aprender.

Ao professor Dr. Walter Lilenbaum, por ter aceitado a parceria, me auxiliado em todos os momentos de dúvida, me respaldando com seus conhecimentos sobre as técnicas moleculares. Em conjunto com a professora Dra. Lauren Hubert Jaeger e toda a equipe do Laboratório de Bacteriologia Veterinária (LaBV) deram uma enorme contribuição no trabalho. Obrigada pelos conhecimentos compartilhados, que enriqueceram e engrandeceram os resultados alcançados.

Aos professores Maria da Glória Buzinaro, Samir Issa Samara e Luiz Augusto do Amaral, pelos conselhos, empréstimo e compra de materiais para o projeto e por todas as ajudas durante meu doutorado, além das considerações e contribuições ao trabalho no processo de qualificação (1º e 2º qualificação).

Ao professor John B. Malone, pela oportunidade de estudar na LSU e trabalhar no laboratório GeoHealth pelo Programa de Doutorado Sanduíche (PDSE).

Ao Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos, que tive o prazer de conhecer, pessoalmente, na disciplina “Tópicos Especiais: Leptospirose Animal” ministrada na FCAV/ UNESP - Jaboticabal, que com suas dicas e conselhos me forneceu informações não encontradas na literatura e segurança para iniciar o projeto da melhor forma. Por doar as estirpes autóctones para o Laboratório de Diagnóstico de Leptospirose e Brucelose (Lablepbru), e quando obtive êxito no isolamento, auxiliar na aproximação com profissionais que poderiam me ajudar a continuar as análises.

Ao Prof. Dr. Fernando Antonio de Ávila que, durante a disciplina “Tópicos Especiais: Introdução aos Conceitos de Etiologia, Isolamento e Identificação de Alguns Grupos Bacterianos”, compartilhou comigo experiências e conhecimentos no isolamento da *Lepstospira* spp.

À Profa. Dra. Anna Monteiro Correia Lima, minha primeira orientadora no mundo científico e acadêmico, tutora do PET me despertando o interesse pela tríade pesquisa, ensino e extensão. Sempre repleta de carinho, amizade e conhecimento.

Ao diretor Pedro Luís da Costa Aguiar Alves e ao vice-diretor Antonio Sergio Ferrauda da FCAV/Unesp Jaboticabal, por terem cedido o transporte para que as coletas fossem possíveis.

Ao motorista da FCAV/ Unesp Jaboticabal José Severino Mazza, por ter sido o 4<sup>o</sup> integrante das coletas, não apenas auxiliando no traslado até os abatedouros, mas em tudo que era necessário, tornando-se parte da equipe.

Ao Assistente de Planejamento do Escritório de Defesa Agropecuária de Jaboticabal Eduardo Yukio Okada Nakaghi, por ter colaborado com o trabalho. Aos proprietários dos matadouros-frigoríficos localizados na Mesorregião de Ribeirão Preto, por terem consentido a coleta de materiais em seus estabelecimentos.

Ao doutorando Néstor Darío Franco Marulanda, por ter compartilhado comigo seus conhecimentos sobre interpretação de sequências nucleotídicas e inferências filogenéticas, sempre com paciência, empenho e disposição para ensinar.

Aos membros da banca examinadora da defesa: Anna Monteiro Correia Lima, Hélio José Montassier, Luis Antonio Mathias, Raul José Silva Girio e Silvio Arruda Vasconcellos, pela disponibilidade de participar da defesa e pelas considerações e contribuições feitas.

Aos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, Marcia Regina Dacal Seguin Amâncio, Roseane Candido, Waldemar Dibelli Junior "Diba" e em especial o Nivaldo Aparecido de Assis, o "Assis", que por vezes fez papel de amigo, pai, mentor e conselheiro, sempre disposto a ajudar; não tenho palavras para expressar o quão importante foram seus ensinamentos e sua ajuda, acreditando no trabalho desde o primeiro momento, ensinando-me todos os passos para que eu pudesse realizar o trabalho da melhor forma.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de Doutorado, e à CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado sanduíche pelo PDSE. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. E ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - 141190/2016-7 GM/GD.

A todos os professores que de alguma forma contribuíram para que eu pudesse concluir esta etapa e me deram subsídio para alcançar meus objetivos. A todos os amigos e pessoas que durante os quatro anos de doutorado de alguma forma participaram desta etapa; diretamente na pesquisa ou me dando apoio. A todos que acreditaram em mim e no meu trabalho.

"A grandeza de uma profissão é talvez, antes de tudo, unir os homens: não há senão um verdadeiro luxo e esse é o das relações humanas". Antoine de Saint-Exupéry

## SUMÁRIO

<b>Assunto</b>	<b>Página</b>
CERTIFICAÇÃO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS .....	xiii
RESUMO.....	xiv
PALAVRAS-CHAVE.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
KEYWORDS.....	xvii
LISTA DE TABELAS.....	xviii
LISTA DE FIGURAS.....	xix
CAPÍTULO 1 - Considerações gerais.....	1
CAPÍTULO 2 - Isolamento e caracterização da <i>Leptospira interrogans</i> sorogrupo Icterohaemorrhagiae de suínos abatidos no Estado de São Paulo.....	12
CAPÍTULO 3 - Isolamento e caracterização de um novo genótipo de <i>Leptospira interrogans</i> sorogrupo Autumnalis de suínos abatidos no Estado de São Paulo.....	29
CAPÍTULO 4 - Isolamento, caracterização molecular e sorológica de <i>Leptospira santarosai</i> sorogrupo Sejroe de suíno do Estado de São Paulo	52
CAPÍTULO 5 - Análise das inferências filogenéticas de cinco isolados de <i>Leptospira interrogans</i> e <i>L. santarosai</i> de suínos, com base nas sequências nucleotídicas dos genes 16s e secY.....	75
CAPÍTULO 6 - Caracterização soropidemiológica empregando estirpes autóctones na técnica de soroaglutinação microscópica aplicada ao diagnóstico da leptospirose em suínos abatidos no Estado de São Paulo...	113
CAPÍTULO 7 - Considerações finais.....	134
APÊNDICE I - Questionário Epidemiológico.....	142



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Jaboticabal




## CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 12276/15 do trabalho de pesquisa intitulado "**Isolamento, caracterização molecular e soroepidemiológica da *Leptospira spp.* em suínos abatidos no Estado de São Paulo**", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Luis Antonio Mathias, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 06 de julho de 2015.

Jaboticabal, 06 de julho de 2015.

  
Profª Drª Paola Castro Moraes  
Coordenadora – CEUA

## ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E SOROEPIDEMIOLÓGICA DA *Leptospira* spp. EM SUÍNOS ABATIDOS NO ESTADO DE SÃO PAULO

**RESUMO** - A carne suína é a proteína de origem animal mais produzida e consumida no mundo, sendo o Brasil o quarto no ranking de produção e exportação mundial, com perspectivas de crescimento. Devido à proximidade homem-animal deste seguimento, é fundamental que se conheça a sanidade dos suínos, e entre as diversas doenças deve-se destacar a leptospirose, uma importante zoonose de caráter ocupacional que atinge vários elos da cadeia produtiva, como: funcionários da granja, médicos veterinários, magarefes e a população em geral. O trabalho teve como objetivo geral realizar isolamento, caracterização molecular e soroepidemiológica da *Leptospira* spp. em suínos abatidos no Estado de São Paulo e como objetivos específicos identificar a variabilidade genética de forma acurada e determinar as sorovariedades presentes. Foram analisadas 1.284 amostras de sangue, 980 amostras de urina e 74 rins de suínos adultos, clinicamente saudáveis, oriundos de granjas das regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul, abatidos em 3 matadouros-frigoríficos localizados na Mesorregião de Ribeirão Preto no Estado de São Paulo, no ano de 2016. Para o diagnóstico sorológico foi utilizada a técnica de soroaaglutinação microscópica com uma coleção de antígenos de 38 sorovares. As amostras de urina e rim foram semeadas em meios de cultivo, e os isolados foram confirmados e caracterizados pelas técnicas de sorogrupagem, PCR (gene *lipL32*), VNTR e sequenciamento nucleotídico dos genes *rrs* e *secY*, e os resultados obtidos foram utilizados para elaborar árvores filogenéticas. Pela técnica de isolamento foi possível ter êxito em 5 culturas, de amostras de tecido renal e urina de suínos, nomeadas Unesp01, Unesp02, Unesp03, Unesp04 e Unesp05, sendo encontradas leptospirosas das espécies *L. interrogans* e *L. santarosai*, dos sorogrupos: Icterohaemorrhagiae (Unesp01 e Unesp05), Autumnalis (Unesp02 e Unesp04) e Sejroe (Unesp03). No sequenciamento nucleotídico dos genes *rrs* (16S) e *secY*, as amostras Unesp01, Unesp02, Unesp04 e Unesp05 demonstraram 100% de similaridade com a sequência de *Leptospira interrogans*, e a amostra Unesp03 demonstrou 99% de similaridade com a sequência da espécie *L. santarosai*. Na sorologia, observou-se 46,57% (598/1.284) de sororreagentes a pelo menos uma das 38 sorovariedades de *Leptospira* spp. utilizadas, apresentando reatividade a 86,84% (33/38) dos sorovares utilizados da coleção de antígenos. A caracterização sorológica e molecular é fundamental para a compreensão da epidemiologia da infecção por este importante agente etiológico. O isolamento propicia material para uma ampla variedade de análises e a possibilidade da utilização do isolado como parte da coleção de antígenos para os testes sorológicos, enquanto a sorologia dá subsídios em estudos em que não há disponibilidade de tempo ou amostra ideal para o isolamento. Os resultados do trabalho demonstram a circulação do agente nas granjas de suínos, condição de risco para os trabalhadores da cadeia produtiva da carne e para a saúde pública em uma visão geral.

**Palavras-chave:** Espiroqueta; Zoonose; Leptospirose; *Sus scrofa domesticus*; Epidemiologia.



## ISOLATION, MOLECULAR AND SEROEPIDEMIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF *Leptospira* spp. IN SWINE SLAUGHTERED IN SÃO PAULO STATE

**ABSTRACT** - Pork is the most widely consumed animal protein in the world, Brazil being the fourth largest producer and exporter in the world, with growth prospects. Due to the man-animal proximity of this follow-up, it is essential to know the sanity of the swines, and among the various diseases should be highlighted leptospirosis, an important occupational zoonosis that reaches several links in the production chain, such as: Farm employees, veterinarians, doctors and the population in general. The objective of this study was to isolate and characterize molecular and seroepidemiologically the *Leptospira* spp. in swine slaughtered in the State of São Paulo, and as specific objectives to identify the genetic variability in an accurate way and determine the serovarieties present. A total of 1,284 blood samples, 980 urine samples and 74 kidneys, of clinically healthy adult swine, from Central-West, Southeast and South swine farms, slaughtered in three slaughterhouses located in the Meso-region of Ribeirão Preto, State of São Paulo, in the year 2016, were analyzed. For the serological diagnosis, the microscopic sero-agglutination technique was used with a collection of antigens of 38 serovars. Urine and kidney samples were seeded in culture media and the isolates were confirmed and characterized by serogrouping, PCR (lipL32 gene), VNTR, and nucleotide sequencing of the *rrs* and *secY* genes, and the results obtained were used to elaborate phylogenetic trees. The isolates were identified in five culture: Unesp01, Unesp02, Unesp03, Unesp04 and Unesp05, and leptospires of the *L. interrogans* and *L. santarosai* species of the serogroups: Icterohaemorrhagiae (Unesp01 and Unesp05), Autumnalis (Unesp02 and Unesp04) and Sejroe (Unesp03). In the nucleotide sequencing of the *rrs* and *secY* gene, the Unesp01, Unesp02, Unesp04 and Unesp05 samples demonstrated 100% similarity to the *Leptospira interrogans* sequence, and the Unesp03 sample demonstrated 99% similarity to the *L. santarosai* sequence. In serology, 46.57% (598/1,284) were seroreactors, observed in at least one of the 38 serovars of *Leptospira* spp. used, presenting reactivity to 86.84% (33/38) of the serovars used in the antigen collection. Serological and molecular characterization is fundamental for the understanding of the epidemiology of infection by this important etiological agent. The isolation provides material for a wide variety of analyzes and the possibility of using it as part of the collection of antigens for the serological tests, while the serology gives subsidies in surveys in studies where there is no time availability or ideal sample for isolation. The results of the work show the circulation of the agent in the pig farms, a risk condition for workers in the meat production chain and for public health in an overview.

**Keywords:** Spirochete; Zoonosis; Leptospirosis; *Sus scrofa domesticus*; Epidemiology.

## LISTA DE TABELAS

## CAPÍTULO 1 - Considerações gerais

### Introdução

A suinocultura é uma importante atividade econômica e social, sendo o Brasil o quarto maior produtor e exportador de carne suína do mundo, devido ao aprimoramento das granjas, que colocou o país em destaque no cenário mundial. No entanto, o setor enfrenta dificuldade no aspecto sanitário e quanto ao destino adequado dos dejetos.

Dada a importância de produzir carne suína com qualidade e segura para a população e para o meio, é fundamental destacar a importância do controle sanitário, dando ênfase às zoonoses, entre elas a leptospirose, uma importante enfermidade bacteriana de ocorrência mundial, responsável por prejuízos econômicos e riscos à saúde da população.

Os suínos podem ser hospedeiros de manutenção e ainda hospedeiros acidentais de diferentes sorogrupos e sorovares de *Leptospira*. Quando há uma adaptação hospedeiro-parasita, as leptospiras são mantidas no trato urinário por longo período, sendo eliminadas pela urina em condições de viabilidade para infectar outros animais e humanos, além de contaminar o meio quando os dejetos, especificamente a urina, são destinados erroneamente, sem tratamento, apresentando um risco para saúde pública.

Apesar de existir vários inquéritos sorológicos de leptospirose suína, poucos são os trabalhos de isolamento e tipificação do agente etiológico, que permitem caracterizar a variabilidade genética e estabelecer o perfil genotípico, fatores essenciais para compreender melhor a epidemiologia da leptospirose e auxiliar no estabelecimento de um programa de controle. Visto que a leptospirose é uma doença que acomete diferentes espécies de animais, é fundamental que se faça a investigação, a caracterização e o controle do agente etiológico.

O sucesso no controle de doenças que acometem diferentes espécies animais está estreitamente associado a diferentes fatores, entre os quais o conhecimento de que se dispõe sobre a história natural da doença, a distribuição espacial e temporal, a frequência de sua ocorrência e os mecanismos disponíveis

para seu controle. Os locais estratégicos para a obtenção de tais informações são aqueles onde os produtos de origem animal, comestíveis ou não, são obtidos ou mesmo processados, como os abatedouros (Riccetti et al., 1989).

Em animais infectados pela *Leptospira* spp., o isolamento tem a capacidade de confirmar a presença de leptospiros viáveis tanto na urina quanto em órgãos, mesmo que o animal esteja aparentemente saudável no momento da coleta. Os perfis genéticos estabelecidos possibilitam verificar as possíveis fontes de infecção, a filogenia e o impacto da intervenção humana, fornecendo subsídios para compreensão da epidemiologia da leptospirose.

Em outro momento, os isolados podem fazer parte da coleção de antígenos locais, aumentando a sensibilidade do teste de soroaglutinação microscópica em campo escuro (MAT), e até mesmo serem utilizados na formulação de vacinas com especificidade regional.

## Referências

Adler B, Moctezuma AP (2010) *Leptospira e leptospirosis*. **Veterinary Microbiology** 140 (3-4): 287-296.

Ahmed A, Engelberts MF, Boer KR, Ahmed N, Hartskeerl, RA (2009) Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic *Leptospira* species in clinical materials. **PLoS One** 18:4(9): e7093.

Azócar Áedo L, Smits HI, Monti G (2014) Leptospirosis in dogs and cats: Epidemiology, clinical disease, zoonotic implications and prevention. **Archivos de Medicina Veterinária** 46: 337-348.

Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E, Vinetz JM (2003) Leptospirosis: A zoonotic disease of global importance. **THE LANCET Infectious Diseases** 3: 757-771.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância (2005) **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília, 816p.

Brasil - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (2002) **Instrução Normativa da Secretaria de Defesa Agropecuária Nº 19 de 15 de fevereiro de 2002**. Disponível em: [https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/legislacao\\_pnss\\_3ID-3MnF3icSTU.pdf](https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/legislacao_pnss_3ID-3MnF3icSTU.pdf). Acesso em: 12 abr. 2015.

Brasil. Ministério da Saúde (1995) **Manual de Leptospirose**. Brasília, 98p.

Capuano DA, Machado JD, Pereira MJB, Pereira TLGM, Kawarabayashi M (1986) Prevalência de infecção leptospirótica em funcionários do biotério do campus de Ribeirão Preto da USP. **Medicina** 19: 103-10.

Crevatin D, Banfi E, Crotti D, Ruaro E, Cinco M (1986) Serosurvey on the presence of leptospiral agglutinins in humans in Northern Italy. **European Journal of Epidemiology** 2: 44-7.

Cullen PA, Xu X, Matsunaga J, Sanchez Y, Ko AI, Haake DA, Adler B (2005) Surfaceome of *Leptospira* spp. **Infection and Immunity** 73: 4853-4863.

Ellis WA. Leptospirosis. In: Straw BE, Zimmerman JJ, D'allaire S, Taylor DJ (2012) **Diseases of Swine**. Blackwell Publishing: Iowa 10: 2818- 2849.

Faine S (1994) **Leptospira and leptospirosis**. CRC Press, Boca Raton, Florida, EUA, 353p.

Gale DA, Everard CO, Carrington DG, Everard JD (1990) Leptospiral antibodies in patients from a Barbadian general practice. **European Journal of Epidemiology** 6: 150-5.

Guerra MA (2013) Leptospirosis: Public health perspectives. Short paper. **Biologicals** 4: 295-297.

Haake DA, Chao G, Zuerner RL, Barnett JK, Barnett D, Mazel M, Matsunaga J, Levett PN, Bolin CA (2000) The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. **Infection and Immunity** 68(4): 2276-85.

Homem VSF, Heinemann MB, Moraes ZMM, Vasconcellos SA, Ferreira F, Neto JSF (2001) Estudo epidemiológico da leptospirose bovina e humana na Amazônia oriental brasileira. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 34(2): 173-180.

Levett PN (2001) Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews** 14(2): 296-326.

Li L, Ojcius DM, Yan J (2007) Comparison of invasion of fibroblasts and macrophages by high- and low-virulence *Leptospira* strains: colonization of the host-cell nucleus and induction of necrosis by virulent strain. **Archives of Microbiology** 188(6): 591-598.

Millar BC, Xu J, Moore JE (2007) Molecular diagnostics of medically important bacterial infections. **Current Issues in Molecular Biology** 9: 21-39.

Miraglia F, Moreno AMM, Gomes CRG, Paixão R, Liuson E, Morais ZMM, Maiorka P, Seixas FK, Dellagostin OA, Vasconcellos SA (2008) Isolation and characterization of *Leptospira interrogans* from pigs slaughtered in São Paulo State, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology** 38: 501-507.

Monte LG, Ridieri KF, Jorge S, Oliveira NR, Hartwig DD, Amaral MG, Hartleben CP, Dellagostin OA (2015) Immunological and molecular characterization of *Leptospira interrogans* isolated from a bovine foetus. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases** 40: 41-5.

Musso D, Lascola B (2013) Diagnostic biologique de la leptospirose. **Revue Francophone des Laboratoires** 449: 39-46.

OIE (2014a) **Listed Diseases, Infections and Infestations in Force in 2014**, Paris. Disponível em: <<http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2014>>. Acesso em: 14 abr. 2015.

OIE (2014b) **Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals**. Paris, 1404p. Disponível em: <[www.oie.int](http://www.oie.int)>. Acesso em: 05 abr. 2018.

Oliveira SV, Arsky MLNS, Caldas EP (2013) Reservatórios animais da leptospirose: Uma revisão bibliográfica. **Saúde** 391: 9-20.

Oliveira SJ (2007) Leptospirose. In: Sobestiansky, J.; Barcellos, D. **Doenças dos Suínos**. Cânone Editorial: Goiânia 2: 194-200.

Pappas G, Papadimitriou P, Siozopoulou V, Christou L, Akritidis N (2008) The globalization of leptospirosis: Worldwide incidence trends. **International Journal of Infectious Diseases** 12: 351-357.

Pavan ME, Cairó F, Pettinari MJ, Samartino L, Brihuega B (2011) Genotyping of *Leptospira interrogans* strains from Argentina by Multiple-Locus Variable-number tandem repeat Analysis (MLVA). **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases** 34: 135-141.

Pourcel C, André-Mazeaud F, Neubauer H, Ramisse F, Vergnaud G (2004) Tandem repeats analysis for the high-resolution phylogenetic analysis of *Yersinia pestis*. **BMC Microbiology** 8: 4-22.

Rende JC, Rigobelo EC, Marin JM, Avila FA (2007) Infecção experimental em suínos jovens com *Leptospira interrogans* sorovar Wolffi: determinação de parâmetros bioquímicos. **Ciência Rural** 37(2): 458-463.

Riccetti RV, Vasconcelos SA, Ito FH, Cortes JDA (1989) Investigação epidemiológica sobre as zoonoses de maior constatação em matadouros. **Revista da Faculdade de Veterinária e Zootecnia - USP** 26: 61-68.

Salaün L, Mérien F, Gurianova S, Baranton G, Picardeau M (2006) Application of multilocus variable-number tandem-repeat analysis for molecular typing of the agent of leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology** 44(11): 3954-3962.

Sarmiento AMC, Azeredo SS, Morais ZM, Souza GO, Oliveira FCS, Gonçalves AP, Miraglia F, Vasconcelos SA (2012) Emprego de estirpes *Leptospira* spp. isoladas no Brasil na microtécnica de soroaglutinação microscópica aplicada ao diagnóstico da leptospirose em rebanhos bovinos de oito estados brasileiros. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 37(7): 601-606.

Soto FRM, Vasconcelos SA, Pinheiro SR, Bernarsi F, Camargo SR (2007) Artigo de revisão: Leptospirose suína. **Arquivo do Instituto Biológico** 74: 379-395.

Stoddard RA, Gee JE, Wilkins PP, McCaustland K, Hoffmaster AR (2009) Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** 64(3): 247-55.

Sykes JE, Hartmann KFL, Moore GE, Stoddard RA, Goldstein RE (2011) Acvim Small animal consensus statement on leptospirosis: diagnosis, epidemiology, treatment and prevention. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 25: 1-13.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution** 28: 2731-2739.

Trabulsi LR, Alterthum F (2004) **Microbiologia** Atheneu: Rio de Janeiro 718p.

Victoria B, Ahmed A, Zuerner RL, Ahmed N, Bulach DM, Quinteiro J, Hartskeerl RA (2008) Conservation of the S10-spc-alpha locus within otherwise highly plastic genomes provides phylogenetic insight into the genus *Leptospira*. **PLoS One** 3: e2752.

Vieira ML, Gama-Simões JM, Collares-Pereira M (2006) Human Leptospirosis in Portugal: A retrospective study of eighteen years. **International Journal of Infectious Diseases** 10: 378-386.



## **CAPÍTULO 7 - Considerações Finais**

### **Desafios Encontrados**

Desde o início da realização do trabalho, havia o desafio de obter êxito no isolamento de *Leptospira* spp. de suínos dos quais não se tinha conhecimento algum sobre origem, sanidade ou quaisquer outras informações. Apenas foi estabelecido que seriam amostras obtidas de animais criados de forma convencional, sem nenhuma influência da pesquisa, para confirmar a infecção e a eliminação do agente. Em caso de sucesso no isolamento, pretendia-se observar se os isolados se manteriam viáveis *in vitro* para serem utilizados na rotina de pesquisa e diagnóstico da leptospirose, além de avaliar se a inclusão das novas estirpes faria diferença na capacidade de detecção do teste.

Para escolha dos animais a serem examinados, tendo em vista que o ciclo de produção é curto, e muitas vezes a detecção de doenças é negligenciada em diferentes fases da criação, foi definido que seriam colhidas amostras ao final do processo, nos animais de terminação. Nessa fase, os animais já passaram por todo o ciclo, e representariam melhor o animal-alvo da pesquisa e se poderia coletar os materiais no momento do abate, sem elevar, dessa forma, o nível de estresse ou sofrimento dos animais além do praticado, e a pesquisa não causaria nenhum prejuízo ao animal. Além disso, o estudo aproveitou, apenas, os materiais que seriam descartados ao longo da linha de abate, propiciando a oportunidade de observar se seriam detectadas leptospirose viáveis, ao ponto de se obter êxito no isolamento, em um ambiente em que várias pessoas estão em contato constante com as vísceras e os fluidos corporais dos animais, como o matadouro-frigorífico.

Em um primeiro momento, houve dificuldade para conseguir estabelecimentos de abate de suínos na região, pois, apesar de constar um número elevado de estabelecimentos junto aos dados de acesso livre da Coordenadoria de Defesa Agropecuária, Centro de Inspeção e Produtos e Origem Animal, Serviço e Inspeção de São Paulo - SISPA, ao entrar em contato, muitos tinham desativado a parte de abate de suínos, deixando o cadastro junto aos órgãos oficiais, para que, no futuro, caso fosse viável, voltassem a abater essa espécie; outros abatedouros fecharam

devido a problemas financeiros, e os que permaneciam abatendo suínos vinham tendo problemas com o fornecimento de animais, dado que no Estado de São Paulo as granjas, na sua maioria, são independentes, com uma produção de suínos considerada pequena se comparada à de granjas integradas, e problemas com a Inspeção Estadual, o que fez com que eles tivessem receio de liberar a entrada de pesquisadores que poderiam presenciar problemas durante o abate e de alguma forma prejudicar a empresa. A autorização de entrada e coleta somente ocorreu após sucessivas ligações, visitas e aceitando a condição de que em nenhum momento seria exposto o nome dos matadouros-frigoríficos ou informação que permitisse identificá-los e viesse a prejudicá-los; por isso, em nenhum momento do texto fornecemos dados ou indicações de quais foram os estabelecimentos envolvidos no estudo.

Com a autorização dos estabelecimentos e o auxílio da UNESP quanto ao transporte, as coletas foram iniciadas, realizadas no horário de abate dos animais, que variava de acordo com o estabelecimento, entre 02h00 e 11h00 da manhã. Durante as coletas eram observado alguns problemas quanto a utilização de EPIs pelos funcionários, que, mesmo em funções com alta exposição aos fluidos corporais e excreções dos animais abatidos, não faziam uso ou, quando utilizavam, eram EPIs de proteção mínima, apenas protegendo as roupas, mas não com a preocupação de prevenir o contato com possíveis patógenos presentes nos animais, encontrando-se nessas funções e condições mulheres gestantes.

Após a coleta dos materiais, o desafio foi o isolamento do agente etiológico propriamente dito, pois utilizando meios de cultura sem antibiótico ocorria o crescimento de contaminantes num período curto, de 24 horas, e para conseguir minimizar esse problema foram adaptadas metodologias e agregadas informações passadas por pesquisadores da área, até conseguirdiminuir a contaminação dos meios num ponto que não prejudicaria a *Leptospira*, se presentes nos meios de cultura, viabilizando uma técnica plausível de ser realizada e com o mínimo de contaminação.

Após os primeiros isolados, a preocupação estava na descontaminação, quando necessário, e conseguir manter as leptospiiras viáveis, pois ao contrário dos sorovares de referência, que têm multiplicação estável em meio de cultura, os

isolados tinham dificuldade de se manterem *in vitro*. Só com o decorrer do tempo os isolados apresentavam multiplicação suficiente para serem utilizados na coleção de antígenos do MAT.

Com o intuito de conseguir mais informações dos animais e de suas respectivas granjas, foi elaborado um questionário (Apêndice 1). No entanto, os nomes dos proprietários e telefones vinculados aos números de GTA obtidos nas coletas continham informações desatualizadas, e os dados de contato atuais foram de difícil obtenção, assim como conseguir a participação e respostas concretas dos proprietários, que tinham receio de que as informações cedidas fossem enviadas para os órgãos de fiscalização. No entanto, após compromisso de que não seria exposta a localização da fazenda, nem os nomes dos responsáveis pelas granjas, foi realizado o questionário. Apenas um proprietário passou a localização, e não foram realizadas visitas para elaborar um diagnóstico de situação em cada granja, até mesmo pela falta de autorização de visita pelos proprietários. Desta forma, só foram utilizados os dados do questionário para extrair fatores de risco das granjas de origem dos animais dos quais foi isolada a bactéria. Por ser um número pequeno de propriedades e algumas respostas serem vagas, só foram utilizadas as informações consistentes, não sendo possível elaborar análise mais detalhada, com estatística multivariada.

### **Diferenças entre os resultados alcançados e os descritos na literatura**

Ao contrário de algumas publicações, que relatam o isolamento num período curto, foi observada, em microscópio de campo escuro, multiplicação sugestiva de *leptospira* apenas a partir de três meses de inoculação, mantendo os meios pelo período de até trinta semanas. Foi observada multiplicação lenta, encontrando poucas leptospiras no meio, que só com o passar das semanas foi aumentando, e em muitos momentos foram observados outros microrganismos, sendo necessário cuidado e descontaminação com passagens em meios com antibiótico e pelo filtro, além de análises constantes para que não haver perda dos isolados.

Em um número considerável de culturas foi observada formação de anel, idêntico ao anel de opalescência característico de multiplicação da *Leptospira*, sinal

descrito por muitos autores como um indicativo de cultura positiva. Mas essas amostras não foram confirmadas como tal. Estes meios foram mantidos no laboratório por um longo período, alguns apresentavam microrganismos característicos, no entanto não foram confirmados por PCR. Com o passar do tempo, o anel desaparecia e os microrganismos que geraram suspeitas não foram mais observados nem no meio original, nem nos repiques que foram feitos durante o tempo. E todas as tentativas de identificar os microrganismos presentes não foram bem-sucedidas.

Mesmo utilizando a quantidade de meio de cultura indicada na literatura, no decorrer do tempo, nos meios que apresentavam necessidade, foi adicionado, em condições assépticas, mais meio, ou as amostras foram repicadas, dessa forma prevenindo secagem ou perda.

Outro dado relevante visualizado foi que os isolados foram obtidos de amostras em meio Fletcher fruto de repique após a amostra ficar o período de 24 horas em meio contendo antibiótico. Não se obteve êxito em meio EMJH, meio mais sugerido por outros autores. Os primeiros repiques com multiplicação ideal também foram em meio Fletcher.

### **Limitações da pesquisa**

A técnica de isolamento apresenta limitações, pois, mesmo que a amostra seja positiva, muitas vezes a bactéria não se multiplica *in vitro*. É possível que a bactéria estivesse presente em mais amostras, mas sem crescimento nos meios de cultura. Como não realizamos PCR das amostras de urina e rim, não foi possível confirmar essa informação.

A técnica de isolamento necessitou de uma grande quantidade de vidraria, meios de cultura e estufas tipo B.O.D., que permaneciam em uso até o final do processo, trinta semanas, fato que limitou a quantidade de coletas diante da quantidade que o laboratório suportava para manter todos os meios de cultura de forma adequada.

As técnicas moleculares, apesar de fornecerem muitas informações, em alguns casos não são adequadas para determinar o sorovar dos isolados, mas sim

espécie e sorogrupo. Na análise dos resultados da sorologia, a dificuldade apontada quando se inseriram as estirpes autóctones foi que, como ocorreram muitas coaglutinações com títulos semelhantes, muitas amostras foram retiradas da análise, e quanto maior o número de antígenos usados no teste menor era a quantidade de amostras dentro dos critérios para estimar o sorovar/estirpe mais provável.

No questionário, além das dificuldades apontadas, foi observado que os proprietários não têm precisão quanto a informações de abortamento e problemas sanitários, pois relataram que não existe caderno de registro zootécnico, dados que proporcionariam informações importantes para avaliar os principais problemas da granja e os fatores de risco de ocorrência da doença estudada.

### **Conclusões proporcionadas pela pesquisa**

A pesquisa foi bem-sucedida, a medida em que conseguiu atingir seus objetivos de realizar isolamento e caracterização molecular e soroepidemiológica da *Leptospira* spp. de suínos abatidos na mesorregião de Ribeirão Preto. Ao final do trabalho obteve-se no isolamento bacteriológico a partir da urina e rim de suínos em cinco culturas, os isolados foram nomeados Unesp01, Unesp02, Unesp03, Unesp04 e Unesp05, sendo encontradas leptospiros das espécies *L. interrogans* e *L. santarosai*, dos sorogrupos Icterohaemorrhagiae (Unesp01 e Unesp05), Autumnalis (Unesp02 e Unesp04) e Sejroe (Unesp03). No VNTR, dois isolados (Unesp02 e Unesp04) se apresentaram com genótipo novo, demonstrando mudanças no perfil genético da *Leptospira*.

Nos três modelos evolutivos obtidos com base no sequenciamento nucleotídico e nas inferências dos genes *rrs*, *secY* e com os dois concatenados, os isolados foram agrupados com outras leptospiros da mesma espécie, sorogrupo e região do isolamento, o que demonstrou que esses fatores podem influenciar a evolução genética das leptospiros e demonstrou a importância de conhecer o agente etiológico que ocorre em cada região, com a finalidade de entender a distribuição dos diferentes sorogrupos/ sorovares e os principais hospedeiros.

Após o isolamento, a inclusão de estirpes autóctones isoladas no Brasil na coleção de antígenos da MAT propiciou aumento significativo do número de suínos

identificados como positivos no teste, especialmente quando as estirpes são de origem da mesma espécie e região do estudo.

Os resultados do trabalho demonstram a circulação do agente causador da leptospirose animal e humana nas granjas de suínos de diferentes regiões do Brasil, condição de risco para os trabalhadores da cadeia produtiva da carne e para a saúde pública em uma visão geral, pois os isolados pertencem a sorogrupos e sorovares descritos como responsáveis pela forma severa da doença.

### **Contribuições proporcionadas pela pesquisa**

Os resultados encontrados no presente trabalho contribuem para a compreensão da leptospirose nos suínos, dando provas da circulação da *Leptospira* spp. nas granjas, fornecendo dados quanto à espécie, ao sorogrupo e às sorovares presentes. Com a caracterização soroepidemiológica dos suínos analisados, observaram-se os sorovares presentes e mais provável, implicados nas infecções desses animais, dados que contribuem para a compreensão da doença na região do estudo, pois com a sorologia se detectam anticorpos de memória imunológica, demonstrando que o animal teve contato com o agente, visualizando a situação sanitária da granja com relação a leptospirose. Já o isolamento fornece dados precisos das leptospiras presentes no momento das coletas, permitindo um conhecimento mais amplo e detalhado, informações que subsidiam o desenvolvimento de planos de ação para o controle e a prevenção da doença.

Além disso, as informações podem ser utilizadas como subsídio para os profissionais da saúde atentarem ao diagnóstico da leptospirose, em especial os profissionais que trabalham de forma direta ou indireta com animais e em áreas com presença de fatores de risco de doença.

Os isolados obtidos fazem parte da coleção de antígenos do Laboratório de Diagnóstico de Leptospirose e Brucelose da FCAV – UNESP Jaboticabal, aumentando a capacidade de detecção da coleção de antígenos do laboratório. Faz parte também da Coleção de Culturas de Bactérias de Interesse Veterinário (CCBVet), acervo organizado pelo Laboratório de Bacteriologia Veterinária da UFF,

que tem como objetivo preservar estirpes bacterianas de referência e cepas de origem veterinária para uso em ensino e pesquisa.

Por fim, contribuiu para o conhecimento das zoonoses presentes no Brasil, em especial no Estado de São Paulo.

### **Desafios para o futuro**

Uma vez que a leptospirose implica problemas de saúde, dentro do conceito de única saúde, acometendo pessoas, animais e podendo estar presente no ambiente, é de grande importância compreender melhor a doença. Muitas vezes, não causa a doença clínica em um animal, mas o torna portador renal responsável pela eliminação e disseminação do agente etiológico, que pode causar a forma clínica muitas vezes grave em outros animais susceptíveis. Para compreender a leptospirose é necessário abranger vários fatores que envolvem a doença, como qual sorogrupo/sorovar/estirpe está presente, dado que pode mudar de acordo com a região e o clima. Como o Brasil tem uma grande diversidade de fauna e flora, além de diferenças quando a estrutura e saneamento, é difícil caracterizar de maneira precisa a doença, dado que seria mais adequado em uma realidade regional, caracterização que, mesmo assim, se apresenta como um desafio.

Outro entrave é a dificuldade da obtenção dados reais sobre a doença, tanto em humanos quanto em animais, pois muitas vezes a leptospirose se manifesta com sinais clínicos diversos, e sem um diagnóstico diferencial pode não ser identificada, ignorada ou até mesmo registrada como outra doença nas estatísticas oficiais. Já foi descrita na literatura uma ampla variedade de doenças, como bacterioses e viroses, que são facilmente confundidas com a leptospirose. Em animais, o MAPA, por meio da instrução normativa 50, de 24/09/2013, listou a leptospirose como doença de espécies múltiplas que requer notificação mensal ao serviço veterinário oficial, no entanto, muitas vezes, assim como em humanos, a doença passa despercebida ou é confundida com outra enfermidade, não sendo diagnosticada.

Um risco ainda não estimado é o manejo inadequado de dejetos de suínos. Na suinocultura, o destino dos dejetos representa um dos maiores limitantes à expansão do segmento. Maneiras de aproveitar esses dejetos estão sendo

estudadas, entre elas a utilização como biofertilizante; nesse contexto, o desafio será saber o risco que essa atividade representará na disseminação de patógenos no meio, entre eles a *Leptospira spp.*

### **Sugestões para novas pesquisas**

Com base nas experiências vividas e nos resultados obtidos durante a realização desta pesquisa, foi observada a importância de se investigar a viabilidade de desenvolver vacinas com foco regional, utilizando estirpes autóctones isoladas da espécie na qual será utilizada a vacina, na tentativa de conferir se esta proporciona imunidade adequada frente a desafios e se o tempo de proteção será mais prolongado, em comparação com as vacinas disponíveis no mercado.

Para tentar compreender melhor a doença diante da diversidade de fauna no Brasil, poderia ser útil a realizar trabalhos com a coleta de amostras de todas as espécies de animais que coabitam a área, tentando fechar o ciclo epidemiológico, e detectar todas as espécies envolvidas nesta área, assim como o modo de transmissão mais importante, para dessa forma tentar quebrar o ciclo da doença.

Para dar mais subsídios sobre o caráter ocupacional da enfermidade, e compreender melhor os riscos de transmissão do agente etiológico em locais como matadouros-frigoríficos e propriedades de produção animal, focar em pesquisas de isolamento e caracterização soropidemiológica dos funcionários desses estabelecimentos considerados de risco, além de avaliar as fichas de saúde, acompanhando casos de funcionários com problemas renais e outros sinais que possam remeter a leptospirose.