

**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.

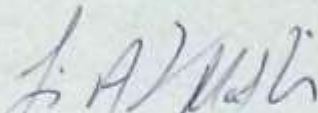
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

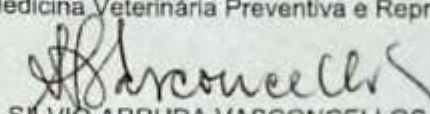
AUTORA: CARLA RESENDE BASTOS

ORIENTADOR: LUÍS ANTONIO MATHIAS

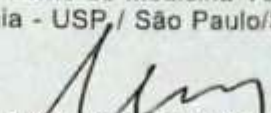
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Medicina Veterinária Preventiva pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. LUÍS ANTONIO MATHIAS

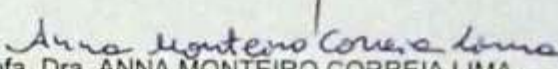
Depto Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. SILVIO ARRUDA VASCONCELLOS

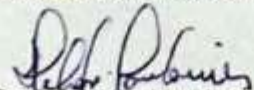
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP / São Paulo/SP


Prof. Dr. RAUL JOSÉ SILVA GRIO

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Profa. 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 Sensu, 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 4º 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

Assunto	Página
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

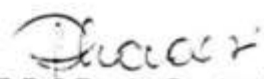


CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

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 soroaglutinação 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 leptospirosis 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 2 - Isolamento e caracterização da *Leptospira interrogans* sorogrupo Icterohaemorrhagiae de suínos abatidos no Estado de São Paulo

Tabela	Título	Página
1.	Estirpes de leptospiros autóctones isoladas no Brasil, segundo sorovar, sorogrupo, espécie e animal de origem.....	18
2.	Resultados da técnica VNTR para genotipagem das amostras Unesp01 e Unesp05. Para cada locus, o número de repetições em tandem foi calculado medindo os tamanhos dos produtos amplificados. Com base nas repetições de cada alvo genético foi estabelecida a estirpe do isolado, representada na tabela pela abreviação, de acordo com Majed e colaboradores (2005).....	21
3.	Sorogrupo, Sororar e número (nº) de reações para cada título de aglutininas de 59 suínos sororreagentes pelo teste de soroaglutinação microscópica, a uma ou mais das 35 sorovariedades de <i>Leptospira</i> spp. empregados ao MAT, entre 165 suínos, abatidos nos meses de fevereiro e junho de 2016, na Mesorregião de Ribeirão Preto.....	23
4.	Número (nº) de amostras sororreagentes pela técnica de soroaglutinação microscópica (MAT) em relação à coleção de antígenos utilizados, comparando os resultados encontrados frente a uma coleção de 24, 33 e 35 antígenos.....	24

CAPÍTULO 3 - Isolamento e caracterização de um novo genótipo de *Leptospira Interrogans* sorogrupo Autumnalis de suínos abatidos no Estado de São Paulo

Tabela	Título	Página
1.	Estirpes de leptospiros autóctones isoladas no Brasil, segundo sorovar, sorogrupo, espécie e animal de origem.....	37
2.	Sorogrupo, Sororar e número (nº) de reações para cada título de aglutininas de 95 suínos sororreagentes pelo teste de soroaglutinação microscópica, a uma ou mais das 35 sorovariedades de <i>Leptospira</i> spp, entre 228 suínos, abatidos nos meses de março e abril de 2016, na Mesorregião de Ribeirão Preto, 2016.....	40

CAPÍTULO 4 - Isolamento, caracterização molecular e sorológica de *Leptospira santarosai* sorogrupo Sejroe de suíno do Estado de São Paulo

Tabela	Título	Página
1.	Estirpes de leptospiros autóctones isoladas no Brasil, segundo sorovar, sorogrupo, espécie e animal de origem.....	59

3. Sorogrupo, Sorovar e número (N°) de reações para cada título de aglutininas de dezassete. suínos sororreagentes pelo teste de soroaglutinação microscópica, a uma ou mais das 34 sorovariedades de <i>Leptospira</i> spp., entre 69 suínos, abatidos no mês de fevereiro, na Mesorregião de Ribeirão Preto, 2016.....	60
4. Posição dos 15 sítios polimórficos característicos da espécie <i>L. santarosai</i> encontrados no isolado Unesp03, observados após o sequenciamento nucleotídico, tendo como o alvo gênico o gene <i>rrs</i>	61
5. Posição dos 91 sítios polimórficos característicos da espécie <i>L. santarosai</i> encontrados no isolado Unesp03, observados após o sequenciamento nucleotídico, tendo como o alvo gênico o gene <i>secY</i>	61

CAPÍTULO 5 - Análise das inferências filogenéticas de cinco isolados de *Leptospira interrogans* e *L. santarosai* de suíno com base nas sequências nucleotídicas dos genes 16S e *secY*

Tabela	Título	Página
1.	Lista de espécies incluídas nas análises com suas respectivas informações de acesso do GenBank, por marcador molecular.....	82
2.	Lista de espécies incluídas nas análises como grupo externo e sua informação de acesso do GenBank por marcador molecular...	86
3.	Lista de isolados obtidos de amostras coletadas em matadouros-frigoríficos da Mesorregião de Ribeirão Preto, com a descrição do material biológico coletado, o mês e o ano em que ocorreu a coleta de materiais, mês e ano do êxito no isolamento e o município de origem dos suínos.....	89
4.	Resultados encontrados na técnica de sorogrupagem dos isolados Unesp01, Unesp02, Unesp03, Unesp04 e Unesp05, detalhando os antissoros, o sorogrupo e o título da reação.....	90
5.	Resultados da técnica VNTR para genotipagem de <i>L. interrogans</i> .	92
6.	Resultado da técnica VNTR para genotipagem de <i>L. santarosai</i>	92
7.	Resultado da análise do gene <i>rrs</i> das amostras Unesp.....	93
8.	Resultado da análise do gene <i>secY</i> do isolados Unesp.....	95
9.	Matrizes e dados estatísticos dos alinhamentos inferidos pela análise Bayesiana (BI).....	96

CAPÍTULO 6 - Caracterização soroepidemiológica empregando estirpes autóctones a técnica de soroaglutinação microscópica aplicada ao diagnóstico da leptospirose em Suínos Abatidos no Estado de São Paulo

Tabela	Título	Página
1.	Estirpes de leptospiras autóctones isoladas no Brasil, segundo sorovar, sorogrupo, espécie e animal de origem.....	116
2	Número de suínos examinados e reagentes no teste de soroaglutinação microscópica para diagnóstico de leptospirose, com a proporção de reagentes e seu respectivo intervalo de confiança, de acordo com a Unidade da Federação de origem das amostras e a coleção de antígenos utilizada. Brasil, 2016.....	118
3.	Tabela de contingência comparando os resultados encontrados no MAT utilizando uma coleção com 24 e 33 antígenos (Ag), para o diagnóstico sorológico da leptospirose em suínos.....	119
4.	Tabela de contingência comparando os resultados encontrados no MAT utilizando uma coleção com 24 e 38 antígenos (Ag), para o diagnóstico sorológico da leptospirose em suínos.....	119
5.	Tabela de contingência comparando os resultados encontrados no MAT utilizando uma coleção com 33 e 38 antígenos (Ag), para o diagnóstico sorológico da leptospirose em suínos.....	120
6.	Resultado do teste de soroaglutinação microscópica para o diagnóstico da leptospirose suína, segundo espécie, sorogrupo, sorovar e frequência dos títulos dos sorovares reagentes. Brasil, 2016.....	121
7.	Sorovar de <i>Leptospira</i> mais provável identificado em inquérito sorológico efetuado pelo teste de soroaglutinação microscópica em 1.284 suínos adultos, abatidos no Estado de São Paulo, segundo a coleção de antígenos (24, 33 e 38 antígenos).....	123
8.	Principais sorovares de <i>Leptospira</i> apontados como mais prováveis, por estado, identificados em inquérito sorológico efetuado pelo teste de soroaglutinação microscópica em 1.284 suínos adultos, abatidos no Estado de São Paulo, segundo a coleção de antígenos (24, 33 e 38 antígenos).....	124
9.	Discriminação das 181 amostras consideradas negativas no teste de soroaglutinação microscópica para diagnóstico de leptospirose com a utilização da coleção de 24 sorovares e que se tornaram reativas com a inserção das estirpes autóctones, considerando estirpes de presentes, nº de reagentes e estado de origem dos suínos testados.....	125

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2 - Isolamento e caracterização da *Leptospira interrogans* sorogrupo Icterohaemorrhagiae de suínos abatidos no Estado de São Paulo

Figura	Título	Página
1.	Percentual (%) de suínos sororreagentes a cada sorogrupo de <i>Leptospira</i> spp. pelo teste de soroaglutinação e % de vezes em que o sorogrupo se apresenta como o mais provável, entre 59 suínos, positivos na sorologia, abatidos na mesorregião de Ribeirão Preto, nos meses de fevereiro e junho de 2016.....	24

CAPÍTULO 5 - Análise das inferências filogenéticas de cinco isolados de *Leptospira interrogans* e *L. santarosai* de suíno com base nas sequências nucleotídicas dos genes 16S e secY

Figura	Título	Página
1.	Imagem de gel de agarose 1,5% com amplificações do alvo lipL32.	91
2.	Sequenciamento nucleotídico do gene rrs (16S rRNA) dos isolados Unesp01, Unesp02, Unesp03, Unesp04 e Unesp05.....	94
3.	Sequenciamento nucleotídico do gene secY dos isolados Unesp01, Unesp02, Unesp03, Unesp04 e Unesp05.....	96
4.	Árvore desenvolvida com base na Inferência Bayesiana do gene rrs. Os valores dos ramos mostram a probabilidade posterior (PP).....	99
5.	Árvore desenvolvida com base na inferência Bayesiana do gene secY. Os valores dos ramos mostram a probabilidade posterior (PP).....	101
6.	Árvore desenvolvida com base na inferência Bayesiana dos genes concatenados. Os valores dos ramos mostram a probabilidade posterior (PP).....	104

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 leptospirosas 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.

Revisão de Literatura

A leptospirose é uma zoonose infecciosa, cosmopolita, que pode acometer seres humanos, animais de vida livre e domésticos (Bharti et al., 2003). Os agentes responsáveis pela doença são espiroquetas patogênicas pertencente à Ordem *Spirochaetales*, Família *Leptospiraceae* e Gênero *Leptospira* (Trabulsi e Althertum, 2004). De classificação complexa, e em constante mudança, atualmente o gênero é dividido em 23 espécies, reunidas em três grupos com base em análises filogenéticas dos genes 16S rRNA: patogênicas (*L. borgpetersenii*; *L. interrogans*; *L. kirschneri*; *L. noguchii*; *L. santarosai*; *L. weilii*; *L. genomospecies*; *L. alstonii*; *L. kmetyi*; *L. mayottensis*.); intermediárias (*L. broomii*; *L. fainei*; *L. inadai*; *L. licerasiae*; *L. wolffi*); e saprófitas (*L. biflexa*; *L. alexanderi*; *L. meyeri*; *L. wolbachii*; *L. genomospecies*; *L. terpstrae*; *L. genomospecies*; *L. vanthielii*; *L. genomospecies*; *L. yanagawae*; *L. idonii*), (Adler e Moctezuma, 2010).

Os roedores sinantrópicos são os mais importantes e conhecidos hospedeiros, mas outras espécies selvagens, domésticas e de produção podem agir como reservatórios significativos de leptospiros (Monte et al., 2015).

A leptospirose suína pertence ao grupo das doenças transmissíveis de grande importância do ponto de vista socioeconômico e sanitário. Fez parte da extinta lista B, e posteriormente foi classificada no âmbito das doenças, infecções e infestações comuns a múltiplas espécies (OIE, 2014a). É descrita mundialmente e já foi relatada em todas as regiões do Brasil (Soto et al., 2007).

Devido à importância dessa doença, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil) exige, para classificação de Granjas de Reprodutores Suídeos Certificadas (GRSC), além de ser livre de peste suína clássica, doença de Aujeszky, brucelose, tuberculose e sarna, que seja livre de leptospirose ou controlada (Brasil, 2002).

No suíno, os principais sorovares de *Leptospira* spp. encontrados em levantamentos sorológicos são: Autumnalis, Bratislava, Canicola, Copenhageni, Grippotyphosa, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Muenchen, Pomona, Tarassovi e Wolffii. O suíno é considerado reservatório dos sorovares: Pomona, Tarassovi e Bratislava, e, desta forma, as espiroquetas localizam-se na luz dos túbulos renais e são eliminadas vivas pela urina durante um longo período (Ellis, 2012). Os sorovares Canicola, Pomona, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae e Tarassovi já foram isolados de suínos (Soto et al., 2007), mas apenas os dois primeiros sorovares tiveram identificação genotípica em suínos do Brasil (Miraglia et al., 2008; Sarmento et al., 2012).

A leptospirose suína também ocorre em países limítrofes do Brasil, como a Venezuela e o Peru, nos quais já foram isolados os sorovares San Martini, Pomona, Tarassovi, Icterohaemorrhagiae e Canicola, e em outros países da América do Sul foram isolados os sorovares Bratislava e Kennewicki de rins de suínos clinicamente sadios abatidos em matadouro-frigorífico (Soto et al., 2007).

A disseminação da leptospirose suína se dá pela urina, que pode contaminar alimentos, água e o meio, pelos fetos abortados e pelas descargas uterinas de animais portadores, podendo infectar animais e humanos de forma direta pela penetração na mucosa, pele íntegra imersa em água ou pele com solução de continuidade (Adler e Moctezuma, 2010). O fato de a *Leptospira* spp. penetrar no organismo do hospedeiro por lesão na pele e mucosas intactas permite disseminação rápida para outros tecidos em um curto período de tempo (Li et al.,

2007). Os anticorpos séricos conseguem conter a infecção na maioria dos órgãos, no entanto as espiroquetas podem persistir nos rins e serem excretadas na urina por semanas ou meses (Levett, 2001).

Em geral a leptospirose suína é uma doença crônica, assintomática, podendo permanecer no rebanho sem manifestação por longos períodos (Ellis, 2012). No entanto, Rende et al. (2007) observaram que muitos animais desenvolvem a forma sintomática da doença, e a descrevem como uma das principais causas de falhas reprodutivas em granjas de suínos de vários estados, principalmente das regiões Sul e Sudeste. Isso se dá pela falta de sinais clínicos nos animais adultos, mas presentes, muitas vezes, nas fêmeas, já que a doença afeta principalmente os órgãos reprodutivos. A ausência de sinais clínicos na maior parte da vida dos animais elucida a negligência dessa doença nos animais de terminação (Ellis, 2012).

O diagnóstico é a base para o controle desta doença, podendo ser realizado a partir de amostras de sangue, urina, líquido cefalorraquidiano ou de tecidos durante a necropsia (Musso e Lascola, 2013). A investigação epidemiológica da leptospirose deve estar relacionada aos fatores de risco e ambientais (Oliveira et al., 2013) e estar aliada a provas laboratoriais (Faine, 1994).

Diferentes técnicas de diagnóstico de leptospirose são descritas na literatura. A escolha da técnica depende do material e dos recursos disponíveis. De forma geral, existem dois tipos de métodos de diagnóstico, os métodos diretos, que permitem a identificação de leptospiros através da cultura ou detecção de DNA mediante análise molecular, e os métodos indiretos ou presuntivos, que permitem detectar anticorpos anti-*leptospira* presentes na amostra (Vieira et al., 2006).

O isolamento é um método de diagnóstico direto considerado definitivo para leptospirose (Faine, 1994); apesar de laborioso é um teste essencial para detecção da fase aguda da doença, quando ainda não são observados anticorpos (Sykes et al., 2011). São microrganismos aeróbios obrigatórios, com temperatura ótima de crescimento de 28°C a 30°C e pH entre 6,8 e 7,4, podem ser cultivados em diferentes meios enriquecidos, como o Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) e o Fletcher enriquecido (Bharti et al., 2003), muitas vezes, acrescidos de antibióticos, como 5-fluorouracil, gentamicina, ácido nalidíxico ou rifampicina, para tornar o meio seletivo (Bharti et al., 2003).

O cultivo e o isolamento são utilizados em estudos epidemiológicos em que a identificação dos sorovares presentes na população é de extrema importância (Ellis, 2012). As leptospiros isoladas e mantidas *in vitro* podem ser tipificadas e ter sua filogenética estabelecida (Pavan et al., 2011).

Após o isolamento, é necessário realizar a confirmação e a identificação da *Leptospira* isolada; para isso, técnicas moleculares vêm sendo amplamente utilizadas, sendo descritas como importantes recursos de diagnóstico e subsídio para investigações epidemiológicas (Soto et al., 2007).

A técnica de PCR pode ser empregada na detecção de genes que estão obrigatoriamente presentes na *Leptospira*, como o 16S rRNA (*rrs*), presentes em todas as bactérias (Millar et al., 2007), que com primers específicos permite identificar o gênero *Leptospira*; ou utilizando sequência do gene *secY*, de 245 pb, com o potencial de auxiliar em análises taxonômicas da *Leptospira* spp. (Victoria et al., 2008).

A PCR pode ser empregada, também, na classificação e distinção das leptospiros, usando genes específicos, como o *lipL32* (Ahmed et al., 2009), responsável por codificar a principal proteína da membrana externa da *Leptospira*, presente apenas nas leptospiros patogênicas (Stoddard et al., 2009) e não adaptadas em laboratório, por sucessivas passagens em meios de cultura (Haake et al., 2000). A restrição do *LipL32* a sorovariantes patogênicas de *Leptospira* sugere fortemente que este é um fator de virulência da bactéria (Cullen et al., 2005).

Com as sequências geradas nas avaliações dos genes-alvos, *rrs* e *SecY*, é possível estudar os modelos evolutivos e árvores filogenéticas, dados que podem orientar na compreensão, no controle e na prevenção da doença (Tamura et al., 2011).

Para adquirir mais detalhes da amostra, e identificar características genéticas, a técnica de VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) vem sendo empregada. No genoma da *Leptospira* há várias sequências repetidas, incluindo sequências de inserção, fator que possibilita a utilização desta técnica, em especial da *L. interrogans* (Salaün et al., 2006). Esta técnica baseia-se na identificação do polimorfismo dos fragmentos amplificados, resultantes dos eventos de inserção e deleção dentro da fração repetida de DNA. A fração de DNA repetido consiste de

regiões denominadas mini-satélites ou repetição em tandem de número variável, fornecendo ao final do processo dados sobre o genótipo da bactéria (Pourcel et al., 2004).

Além das técnicas diretas, os métodos sorológicos são muito utilizados, sendo a soroaglutinação microscópica (MAT) considerada a forma indireta de investigação mais adequada, além de preconizada como método de referência pela Organização Mundial de Saúde (OIE, 2014b), sendo capaz de fornecer dados sobre a situação sanitária da granja (Oliveira, 2007).

A leptospirose animal representa um ponto de preocupação para os profissionais envolvidos com a saúde animal e a saúde humana (Guerra, 2013), com notável importância no Brasil, país no qual é considerada uma doença endêmica, com surtos em humanos e animais (Brasil, 2005). Por ser uma doença comumente relacionada a fatores socioeconômicos e ambientais, ocorre em maior frequência em países em desenvolvimento e de clima tropical e subtropical (Pappas et al., 2008), pois o alto índice pluviométrico, temperaturas elevadas e umidade garantem a sobrevivência e manutenção da *Leptospira* spp. no ambiente, influenciando a forma de ocorrência da doença (Brasil, 1995).

Além do seu caráter sazonal, no período em que o clima favorece a permanência do agente no ambiente, a leptospirose é uma zoonose ocupacional, atingindo diferentes categorias profissionais, como trabalhadores rurais (Gale et al., 1990), profissionais de abatedouros (Crevatin et al., 1986) e de toda a cadeia de produção animal (Capuano et al., 1986).

Diante da importância da doença e da necessidade de seu controle, é imprescindível a compreensão da epidemiologia da leptospirose, que só será melhor entendida com estudos que utilizem métodos indiretos e diretos de diagnóstico em conjunto para identificação e confirmação dos sorovares envolvidos nas infecções, possibilitando o estudo mais aprofundado e que conduza a melhores formas de controle (Homem et al., 2001).

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. 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>. 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, Vasconcellos 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, Vasconcellos 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 2 - Isolamento e caracterização da *Leptospira interrogans* sorogrupo Icterohaemorrhagiae de suínos abatidos no Estado de São Paulo

Resumo - A leptospirose é uma doença infecciosa que deve ser estudada no contexto da saúde única, para melhor entendimento da epidemiologia da doença. O objetivo do trabalho foi isolar e realizar caracterização sorológica e molecular de *Leptospira* spp. Para isso, foram coletadas 165 amostras de sangue, 135 amostras de urina e doze rins de suínos adultos abatidos em matadouros-frigoríficos localizados no Estado de São Paulo, no ano de 2016. Para o diagnóstico sorológico foi utilizada a técnica de soroaglutinação microscópica (MAT). As amostras de urina e rim foram semeadas em meios de cultivo e os isolados foram caracterizados pelas técnicas de sorogrupagem, PCR (Polymerase Chain Reaction), VNTR (variable number of tandem repeats) e sequenciamento nucleotídico dos genes *rrs* e *secY*. Na sorologia, observou-se 33,33% (55/165) de sororreagentes a pelo menos uma das 35 sorovariedades de *Leptospira* spp. utilizadas. Das culturas de urina e amostra renal, dois isolados foram obtidos de 147 amostras e sorogrupados como pertencentes ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae. No sequenciamento nucleotídico dos genes *rrs* e *secY*, as amostras demonstraram 100% de similaridade com a sequência de *Leptospira interrogans*. O genótipo pela técnica do VNTR identificado nas amostras foi o I3/I6, característico dos sorovares Icterohaemorrhagiae/Copenhageni. A caracterização sorológica e molecular é importante para a compreensão da epidemiologia da infecção por este importante agente etiológico.

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

Introdução

A leptospirose suína pertence ao grupo das doenças transmissíveis de grande importância do ponto de vista socioeconômico e sanitário, classificada no âmbito das

infecções relacionadas a múltiplas espécies animais (OIE, 2014a). É descrita mundialmente e já foi relatada em todas as regiões do Brasil (Soto et al., 2007). Devido a sua importância na suinocultura, todas as Granjas de Reprodutores Suídeos Certificadas (GRSC), devem ser livres de leptospirose ou controladas (Brasil, 2002).

Geralmente a leptospirose suína é uma doença crônica assintomática (Ellis, 2012). No entanto, quando sintomática é descrita como uma das principais causas de falhas reprodutivas em granjas, pois afeta principalmente órgãos reprodutivos (Rende et al., 2007).

A leptospirose animal preocupa sanitaristas, necessitando de constante vigilância (Guerra, 2013) e investigações epidemiológicas (Oliveira et al., 2013) aliando sorologia e métodos diretos para a confirmação e caracterização dos sorotipos envolvidos, para um estudo aprofundado da infecção por *Leptospira* spp. (Homem et al., 2001).

O isolamento é um método de diagnóstico direto considerado definitivo para leptospirose (Faine, 1994); apesar de complexo, permite um conhecimento mais preciso da ocorrência da doença (Skykes et al., 2011). O cultivo e o isolamento são utilizados para identificar dos sorovares presentes na população (Ellis, 1992), e as leptospiros isoladas e mantidas *in vitro* podem ser tipificadas e suas características fornecer subsídio para estratégias de controle (Sykes et al., 2011). Já o diagnóstico sorológico fornece dados sobre a situação sanitária da granja, sendo a soroaglutinação microscópica (MAT) considerada a forma indireta de investigação mais adequada (OIE, 2014b). Diante disso, o objetivo do trabalho foi isolar e realizar caracterização sorológica e molecular de *Leptospira* spp. em suínos abatidos no Estado de São Paulo.

Material e Métodos

Comissão de Ética no Uso de Animais

O trabalho foi submetido à Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Câmpus de Jaboticabal/Unesp – SP, Brasil, e, por estar dentro dos princípios éticos

na experimentação animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado sob nº 12276/15.

Local do estudo e colheita do material

O Estado de São Paulo é responsável por 28,7% do PIB brasileiro, detém o sexto maior rebanho nacional de suínos, com 4,91% da produção nacional (182 mil toneladas) (Brasil, 2017), e sexto no ranking anual de abate de suínos (IBGE, 2017). O presente estudo foi observacional analítico e não intervencionista, com delineamento do tipo transversal. Para este estudo foram coletadas, no total, 165 amostras de sangue, 135 amostras de urina e doze rins, divididos em duas coletas, a primeira coleta com 65 amostras de sangue, sessenta amostras de urina e seis rins de suínos adultos, oriundos de uma granja localizada no município de Monte Alto - SP; e a segunda coleta com cem amostras de sangue, 75 amostras de urina e seis rins de suínos adultos provenientes de uma granja localizada no município de Campo Grande - MS, animais clinicamente saudáveis, abatidos em matadouros-frigoríficos localizados na Mesorregião de Ribeirão Preto no Estado de São Paulo, nos meses de fevereiro e junho, respectivamente, no ano de 2016.

As amostras de sangue foram coletadas no momento da sangria na linha de abate, em tubos descartáveis de coleta de sangue sem aditivo. Imediatamente após a coleta, o sangue foi mantido em temperatura ambiente até a retração do coágulo, posteriormente o soro foi transferido para microtubos e estocado a -20°C até a realização dos testes sorológicos.

As amostras de urina foram coletadas por punção de bexiga (cistocentese) na linha de abate, na quantidade de 5 a 10 mL/animal, com auxílio de seringas esterilizadas. Os rins foram colhidos durante a fase de evisceração, armazenados individualmente em sacos de polipropileno esterilizados, devidamente vedados e identificados.

No primeiro momento, a urina foi armazenada em temperatura ambiente, e os rins armazenados em caixa isotérmica contendo gelo para manutenção da temperatura entre 2°C e 8°C, para, em condições assépticas, serem semeadas no meio de cultivo.

Isolamento

Um fragmento de aproximadamente 3 cm³ da região do parênquima renal foi extraído de cada rim coletado. A manipulação dos órgãos ocorreu dentro de uma câmara de fluxo laminar. Cada fragmento foi colocado dentro de coletor universal esterilizado, onde foi triturado cuidadosamente, e acrescentados 10 mL de solução NaCl 0,9%. Posteriormente o conteúdo foi homogeneizado levemente e o material deixado por uma hora em repouso para separar o sobrenadante do precipitado. O sobrenadante e a urina foram filtrados e semeados com o auxílio de seringas descartáveis esterilizadas acopladas a um filtro de 0,22 µm (filtro de seringa KASVI, k18-230, PES membrane, Max. Pressure: 4,5 bars), manuseados em condições assépticas.

Por amostra foram utilizados dois tubos de meios de cultura: um contendo meio de cultura semissólido, Fletcher, e outro com meio líquido, EMJH (Thiermann, 1984), inicialmente com antibiótico 5-fluorouracil e ácido nalidíxico (Miraglia et al., 2009), contendo 10 mL de meio cada. Por tubo foram inoculadas aproximadamente cinco gotas de filtrado e após 24 horas foi realizado um repique do meio com antibiótico para um meio sem antibiótico. Os tubos foram armazenados em estufa tipo B.O.D. a 29°C ± 1°C e examinados visualmente em microscopia de campo escuro semanalmente, por até 30 semanas.

Dos meios com suspeita de multiplicação de *Leptospira* spp. foram repicadas alíquotas para observação em microscopia de campo escuro com objetiva de 10x e caracterização molecular.

Sorogrupagem

Para estimar o sorogrupo ao qual pertencem as amostras de isolados bacterianos de *Leptospira* isoladas foi utilizada a técnica de sorogrupagem de acordo com Faine e colaboradores (1999), Todos os isolados obtidos foram testados contra 32 antissoros (Andamana, Bratislava, Australis, Autumnalis, Castellonis, Bataviae, Canicola, Celledoni, Codice, Cynopteri, Djasiman, Grippotyphosa, Hebdomadis, Holland, Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Lousiana, Lyme, Manhao, Mini, Panama, Pomona, Pyrogenes, Pinchang,

Sarmin, Hardjoprajitno, Hardjobovis, Wolff, Patoc, Shermani e Tarassovi), correspondentes a 28 sorogrupos (Andamana, Australis, Autumnalis, Ballum, Bataviae, Canicola, Caledoni, Codice, Cynopteri, Djasiman, Grippotyphosa, Hebdomadis, Holland, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Lousiana, Lyme, Manhao, Mini, Panama, Pomona, Pyrogenes, Ranarum, Sarmin, Sejroe, Semaranga, Shermani e Tarassovi), fornecidos pelo Royal Tropical Institute (KIT, Amsterdã).

Extração de DNA e reação em cadeia da polimerase

Culturas de *Leptospira spp.* com multiplicação bacteriana entre 10^7 e 10^8 células por mL foram submetidas a extração de DNA com Wizard SV Genomic DNA Purification System® (Promega) conforme instruções do fabricante.

Para determinar se as leptospiros eram patogênicas, foi realizada a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional para o gene lipL32, com os primers LipL32-45F e LipL32-286R (Stoddard et al., 2009). Já a determinação da espécie de *Leptospira* foi obtida por meio de PCR e sequenciamento nucleotídico dos genes rrs (16S rRNA) e secY. Os primers utilizados para a amplificação do 16S foram 16S fD1 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' e 16S rP2 5'-ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT-3' (Weisburg et al., 1991). Os primers utilizados para a amplificação do secY foram secYF 5'-ATG CCG ATC ATT TTT GCT TC-3' e secYR 5'-CCG TCC CTT AAT TTT AGA CTT CTT C-3' (Ahmed et al., 2006). A eletroforese em gel de agarose 1,5%, utilizando o corante GelRed (Invitrogen), foi realizada, e os resultados foram visualizados sob luz ultravioleta. A estirpe Fiocruz L1-130 foi utilizada como controle positivo, além de controles negativos da extração e da PCR.

Sequenciamento nucleotídico

Os produtos de PCR foram purificados com GFX PCR DNA Gel Band Purification kit (GE HealthCare). A reação de sequenciamento nucleotídico foi realizada utilizando o BigDye Terminator v3.1 kit (Applied Biosystems). O sequenciamento nucleotídico do gene rrs incluiu a utilização de primers internos, Lepto16SF1 5'-GGC GGY GCT CTT WAW CAT-3' e Lepto16SR2 5'-ATC CCG TTC ACT ACC CAC GC-3' (Fenner et al., 2010), além dos anteriormente descritos. A

eletroforese capilar foi realizada em sequenciador automático ABI 3730 (Applied Biosystems).

Variable-Number Tandem-Repeat (VNTR)

A técnica do VNTR foi realizada na tentativa de genotipar as estirpes de *Leptospira*. O protocolo envolveu 3 alvos genéticos: VNTR4 (primers F 5'-CAA AAT CAG TCA CTA CCC TG-3' e R 5'-CTT TGT TGG AGC GCA ATC TC-3'); VNTR7 (primers F 5'-TCA TCT GCT CCG GAG ATT CG-3' e R 5'-TCC CTC CAC AGG TTG TCT TG-3'); e VNTR10 (primers F 5'-TCC AAA ATT CAG CCC TCA AG-3' e R 5'-GAC GCT TGG CAT TTG TAT CC-3'), conforme Majed e colaboradores (2005). A eletroforese em gel de agarose 1,5%, utilizando o corante GelRed (Invitrogen), foi realizada, e os resultados foram visualizados sob luz ultravioleta. O número de repetições de cada alvo de VNTR foi calculado segundo Salaün e colaboradores (2006).

Técnica de soroaglutinação microscópica (MAT)

As amostras de sangue foram coletadas para realização de sorologia pela técnica de soroaglutinação microscópica (MAT), de acordo com a metodologia descrita pela OIE (2014b), utilizando uma coleção de antígenos contendo 35 sovars (Andamana, Australis, Bratislava, Autumnalis, Butembo, Castellonis, Bataviae, Canicola, Whitcombi, Cynopteri, Sentot, Grippotyphosa, Hebdomadis, Copenhageni, Icterohemorrhagiae, Javanica, Panama, Pomona, Pyrogenes, Hardjo, Wolffi, Patoc, Shermani, Tarassovi, as estirpes autóctones isoladas de animais no Brasil: Guaricura, Goiano, LO10, LO04, GR6, 2A-CAP, Brasiliensis, 110/06, LO14, e posteriormente ao isolamento, os isolados descritos no trabalho: Unesp01 e Unesp05), tabela 1.

Tabela 1. Estirpes de leptospiros autóctones isoladas no Brasil, segundo sorovar, sorogrupo, espécie e animal de origem.

Estirpe	Sorovar	Sorogrupo	Especie	Animal
Guaicurus	Guaricura	Sejroe	<i>L. santarosai</i>	Búfalo
Goiano	Goiano	Hebdomadis	<i>L. interrogans</i>	Bovino
LO10	Copenhageni	Icterohaemorrhagiae	<i>L. interrogans</i>	Bovino
LO4	Canicola	Canicola	<i>L. interrogans</i>	Suíno
GR6	Pomona	Pomona	<i>L. interrogans</i>	Suíno
2A – CAP	Bananal	Grippotyphosa	<i>L. santarosai</i>	Capivara
BRA	Brasiliensis	Bataviae	<i>L. santarosai</i>	Gambá
110/06	-	Pomona	<i>L. kirschneri</i>	Cachorro do Mato
LO14	Canicola	Canicola	<i>L. interrogans</i>	Canino
Unesp01	Copenhageni/ Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	<i>L. interrogans</i>	Suíno
Unesp05	Copenhageni/ Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	<i>L. interrogans</i>	Suíno

Resultados e Discussão

Isolamento

Das 147 culturas, de urina e rim, quatorze (9,52%) contaminaram-se com outros microrganismos, especialmente fungos, 131 (89,11%) foram descartadas como culturas negativas ao final de trinta semanas, e duas (1,36%) amostras resultaram em culturas positivas, nas quais foi observada formação de anel de opalescência. Os isolamentos foram verificados por observação em microscópio de campo escuro, sendo visualizadas estruturas semelhantes a espiroquetas. As culturas puras foram nomeadas Unesp01 e Unesp05.

A primeira amostra positiva no isolamento foi uma cultura de urina de suíno, coletada em fevereiro de 2016 de um animal oriundo de Monte Alto - SP, com visualização de multiplicação de *Leptospira* em maio do mesmo ano; este isolado foi nomeado Unesp01. Já o segundo isolado foi obtido de uma amostra de urina coletada em junho de 2016 de um animal oriundo de Campo Grande – MS, com multiplicação aparente em janeiro de 2017, nomeada Unesp05. As culturas necessitaram de 13 e 29 semanas, respectivamente, para obter multiplicação suficiente para visualização em microscópio de campo escuro e ter a concentração adequada para realizar os testes de caracterização.

O ciclo de produção do suíno tem, na maior parte das criações, de 5 a 6 meses, sendo o período de terminação de 90 a 150 dias no modo de criação intensivo. Nesse período existe um intenso rodízio de colaboradores, que muitas

vezes não aderem à utilização de EPI's. Um suíno em terminação produz 8,60 litros de urina por dia (Oliveira, 2003), e a urina pode conter patógeno que, se o dejetos não for tratado adequadamente, será lançado no ambiente, podendo se tornar um risco para a população. Desta forma, é importante se ater a dados ambientais que facilitam a disseminação desses patógenos no ambiente, como a chuva, que proporciona um ambiente ideal para manutenção e disseminação das leptospiros.

Os isolamentos ocorreram de amostras obtidas em duas estações climáticas distintas, chuvosa e seca, com diferença de índice pluviométrico e temperatura nos meses de coleta. Em fevereiro de 2016, mês em que foi obtida a amostra que posteriormente deu origem ao isolado, o índice pluviométrico no município de Monte Alto – SP foi de 228 mm/mês e a temperatura média foi de 23,1°C. Nos seis meses anteriores ao abate, ciclo de produção, os índices eram altos, média de índice pluviômetro de 187,83 mm e temperatura de 21,93°C (Clima-Data, 2016). Já nos meses de junho e outono, mês em que foi coletada a estirpe Unesp05, o valor encontrado na cidade de Campo Grande - MS foi de 48,80 mm/mês e temperatura média de 20,15°C, e a média dos últimos seis meses havia sido de 180,7 mm e temperatura de média de 24,33°C. Apesar de no mês de coleta o índice pluviométrico ter sido baixo, nos meses anteriores o índice foi alto (CEMTEC, 2016). Devido à possibilidade de o suíno estar eliminando de forma intermitente a *Leptospira* na urina em diferentes épocas do ano, associada com o isolamento e a presença de fatores ambientais que possibilitam dispersão da doença entre os animais e humanos presentes na região, é fundamental a caracterização do isolado para melhor identificação da leptospira presente, para conseguir dessa forma compreender seu ciclo epidemiológico e atuar de maneira efetiva para o controle da doença.

Em períodos de elevação na temperatura e altos índices pluviométricos, há maior número de surtos de caráter sazonal, sendo a leptospirose humana intimamente relacionada com o período chuvoso do verão, pois, com o aumento do volume de água, a bactéria é transportada para diferentes partes do ambiente com mais rapidez devido ao auxílio das águas de chuva e inundações (Aleixo e Neto, 2010). O isolamento nesta estação demonstra a necessidade de detectar previamente os animais infectados, com o intuito de realizar programas de

prevenção direcionados em uma visão de saúde única e, com isso, diminuir o número de casos de leptospirose em humanos e animais esperados para esse período.

Já o isolamento em estação de baixo índice pluviômetro mostra que a doença não pode ser negligenciada fora do período das chuvas, pois a produção de suínos ocorre durante todo o ano, e, apesar da ausência de água de inundações que facilitam a disseminação da bactéria no ambiente representando um risco a saúde pública, durante todo o ano os profissionais como tratadores e magarefes têm contato constante com os animais e suas secreções, o que demonstra a importância da leptospirose como zoonose ocupacional o ano todo. Esse fato vem ao encontro de observações de McBride e colaboradores (2005), que descrevem que a doença nesse hospedeiro, o suíno, por ser predominantemente subclínica, torna-o uma importante fonte de infecção silenciosa e um risco para profissionais da área, pois pode eliminar quantidades significativas de leptospiras na urina por períodos de até um ano após a infecção.

O isolamento tem grande importância na elucidação da epidemiologia da leptospirose, pois, além de comprovar que a bactéria está sendo eliminada no ambiente, fornece informações sobre fontes de infecção, fatores de risco e permite o conhecimento exato e detalhado dos sorovares existentes em determinada região, auxiliando, deste modo, no controle da enfermidade (Vasconcellos, 1987).

Caracterização molecular

Os isolados foram submetidos a diferentes técnicas para identificação da espécie de *Leptospira* spp. das culturas e do sorogrupo ao qual pertenciam. A primeira técnica utilizada após a observação em microscópio de campo escuro foi a sorogrupagem, na qual os dois isolados demonstraram reatividade ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae, identificando no isolado Unesp01 os títulos de 6.400 para o sorovar Icterohaemorrhagiae e de 3.200 para o sorovar Copenhageni e no isolado Unesp05 os títulos de 25.600 para o sorovar Icterohaemorrhagiae e 102.400 para o sorovar Copenhageni. Os dois isolados de leptospira foram positivos na PCR para o gene LipL32 e, portanto, têm potencial patogenicidade.

Com o sequenciamento nucleotídico dos genes *rrs* e *secY* foi identificada a espécie dos isolados como *L. interrogans*. As sequências foram registradas no GenBank, o isolado Unesp01 com os números de acesso MH686119, para o gene-alvo *rrs*, e MH683045, para o gene-alvo *secY*, e o isolado Unesp05 com os números de acesso: MH686120, para o gene-alvo *rrs*, e MH683046, para o gene-alvo *secY*. Já a técnica de VNTR identificou o genótipo I3/I6 (VNTR4 = 2, VNTR7 = 1 e VNTR10 = 7) (Tabela 2), característico dos sorovares Icterohaemorrhagiae/Copenhageni. Há uma semelhança sorológica e genética entre esses sorovares (Majed et al., 2005), fato que explica a impossibilidade da técnica de VNTR e de outras técnicas de diferenciá-los (Galloway e Levett, 2010).

Tabela 2. Resultados da técnica VNTR para genotipagem das amostras Unesp01 e Unesp05. Para cada locus, o número de repetições em tandem foi calculado medindo os tamanhos dos produtos amplificados. Com base nas repetições de cada alvo genético foi estabelecida a estirpe do isolado, representada na tabela pela abreviação, de acordo com Majed e colaboradores (2005).

Estirpe	Número de repetições			Genótipo
	VNTR4	VNTR7	VNTR10	
Icterohaemorrhagiae/Copenhageni (Majed et al., 2005)	2	1	7	I3/I6
Unesp01	2	1	7	I3/I6
Unesp05	2	1	7	I3/I6

No presente estudo os isolados foram tipificados como *Leptospira interrogans* do sorogrupo Icterohaemorrhagiae, sorovares Icterohaemorrhagiae/Copenhageni. Os isolados encontrados reforçam a preocupação com relação à saúde pública, pois estes sorovares são descritos como os mais prevalentes em pacientes humanos no Brasil (Galloway e Levett, 2010), e o sorogrupo Icterohaemorrhagiae é o mais comum de encontrar em roedores (Ko et al., 1999). O *Rattus rattus* é a espécie de roedor predominante no meio rural, e um dos principais reservatórios desses sorovares, associado a um risco maior de transmissão a animais de produção, como bovinos e suínos (Mathias et al., 2008).

Apesar de todos os cuidados de biosseguridade estabelecidos nas granjas, muitas vezes roedores são encontrados nesses locais, tendo acesso a água e

alimento, podendo ser os responsáveis pela transmissão de leptospirose para os animais da granja. Todavia após a infecção os suínos podem se tornar fontes para pessoas e demais animais, mantendo a bactéria e fazendo parte de sua cadeia epidemiológica, evidenciando que o suíno, além de se infectar, pode eliminar a bactéria viável no meio, sem demonstrar sinais clínicos, albergando esse patógeno de forma silenciosa.

Caracterização sorológica

Pelo MAT, das amostras de sangue coletadas em fevereiro, 29,2% (19/65 amostras) foram sororreagentes, apresentando reatividade a quatro sorovares (Tabela 3), destacando como sorovares mais prováveis Unesp05, Unesp01, Autumnalis e Butembo, dos sorogrupos Icterohaemorrhagiae e Autumnalis, respectivamente (Tabela 3), com títulos de 100 a 200. Do grupo, cem amostras coletadas em junho, 40% (40/100) foram sororreagentes, com títulos ≥ 100 , contra doze sorovares (Tabela 3), observando-se como sorovares mais prováveis: Icterohaemorrhagiae, Unesp01, Unesp05, Bratislava, Patoc, Guaicura, Autumnalis e Butembo, dos sorogrupos Icterohaemorrhagiae, Australis, Semaranga, Sejroe e Autumnalis, e títulos que variaram de 100 a 800 (Figura 1).

A caracterização do sorovar mais provável é realizada a partir de sorovares que apresentaram maior título no MAT, e em casos de coaglutinação, com títulos idênticos, não é possível estabelecer o sorovar mais provável. Essa caracterização deve sempre ser considerada, pois este reflete o provável sorovar infectante (Bolin, 1996). Seguindo esse critério, foram desconsideradas para essa análise, três amostras da coleta realizada em fevereiro e nove do mês de junho.

Apesar da observação de diferentes sorovares e sorogrupos como mais prováveis, 46 dos 59 animais, 77,96% dos animais sororreagentes, apresentaram reatividade ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae, resultado que, junto com o isolamento, reforça a importância desse sorogrupo, não só na granja como para a saúde pública, pois está presente, nos animais, estimulando o sistema imune, podendo causar a doença no suíno e a partir dele chegar ao ambiente por meio da urina, contaminando áreas coabitadas por outras espécies, como o ser humano. Os resultados encontrados, sugerem ainda, que as informações encontradas na

sorologia têm credibilidade frente ao isolamento, pois ambas apresentaram resultados positivos para o mesmo sorogrupo.

Apesar de as estirpes isoladas Unesp01 e Unesp02 terem sido caracterizadas como *Icterohaemorrhagiae/Copenhageni*, elas não apresentaram os mesmos resultados dos sorovares padrões *Icterohaemorrhagiae* e *Copenhageni* individualmente. Uma hipótese para essa diferença de resultados é que estirpes com isolamento recente têm poucas passagens e têm reatividade maior no teste.

Tabela 3. Sorogrupo, Sorovar e número (n°) de reações para cada título de aglutininas de 59 suínos sororreagentes pelo teste de soroaglutinação microscópica, a uma ou mais das 35 sorovariedades de *Leptospira* spp. empregados ao MAT, entre 165 suínos, abatidos nos meses de fevereiro e junho de 2016, na Mesorregião de Ribeirão Preto.

Amostras Reagentes		Mês da coleta										
Sorogrupo	Sorovar	Fevereiro					Junho					
		Título				MP	Título				MP	TMP
		100	200	400	800		100	200	400	800		
		n°	n°	n°	n°		n°	n°	n°	n°		
Autumnalis	Autumnalis	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	2
	Butembo	2	0	0	0	1	2	0	0	0	1	2
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	0	0	0	0	0	26	1	1	0	10	10
	Copenhageni	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	Unesp01	7	0	0	0	3	3	4	2	1	5	8
	Unesp05	12	2	0	0	11	0	0	0	4	4	15
Sejroe	Wolffi	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
	Guaicura	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1	1
Djasiman	Sentot	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
Australis	Bratislava	0	0	0	0	0	17	1	0	0	7	7
Semarang	Patoc	0	0	0	0	0	1	2	0	0	2	2
Ballum	Castellonis	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0

MP = n° de vezes em que o sorovar/sorogrupo apareceu como o mais provável por mês de coleta.

TMP = n° total de vezes em que o sorovar/ sorogrupo apareceu como o mais provável.

Em relação à coleção de antígenos utilizadas no teste, quando utilizada a coleção de referência (24 sorovares) adicionada das estirpes autóctones isoladas de animais em diferentes partes do Brasil, coleção de 33 antígenos, a reatividade passa de 41 animais positivos para 42, aumento de 2,43% (Tabela 4). No entanto, quando utilizada uma coleção de referência adicionada de estirpes autóctones e os isolados

encontrados no trabalho (35 antígenos), foi possível observar aumento do número de reagentes de 40 animais para 59, aumento de 47,5%, fato que demonstra a importância de utilizar isolados regionais nos testes sorológicos.

Figura 01. Percentual de suínos sororreagentes a cada sorogrupo de *Leptospira* spp. pelo teste de soroaglutinação e percentual de vezes em que o sorogrupo se apresenta como o mais provável, entre 59 suínos, positivos na sorologia, abatidos na mesorregião de Ribeirão Preto, nos meses de fevereiro e junho de 2016.

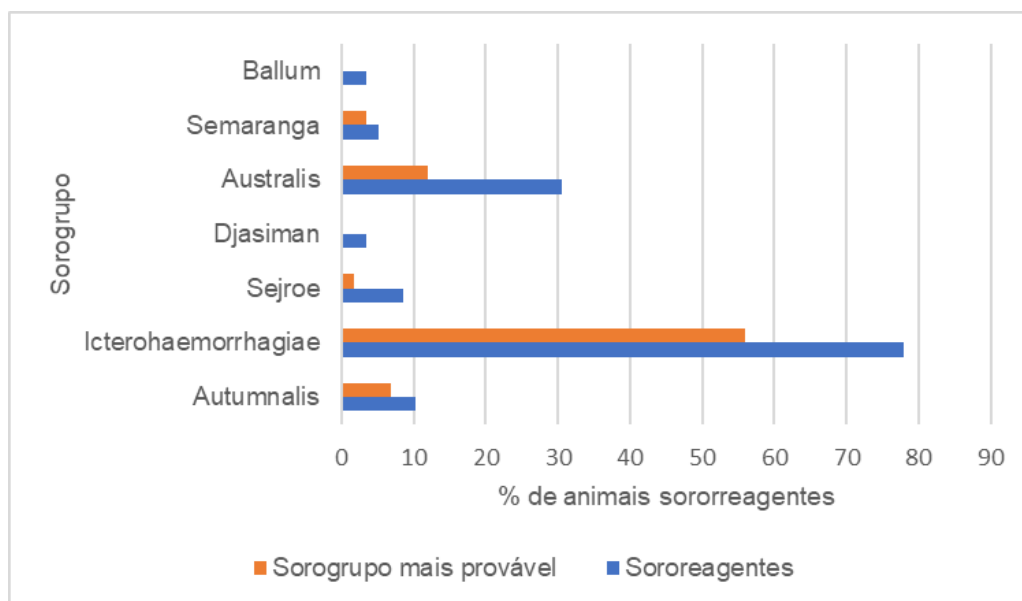


Tabela 4. Número (nº) de amostras sororreagentes pela técnica de soroaglutinação microscópica (MAT) em relação à coleção de antígenos utilizados, comparando os resultados encontrados frente a uma coleção de 24, 33 e 35 antígenos.

Coleção de antígenos	Amostras sororreagentes		
	Coleta		Total
	Fevereiro	Junho	
	nº	nº	nº
24 sorovares*	3	38	41
33 sorovares**	3	39	41
35 sorovares***	19	40	59

* Coleção de antígenos de referência

** Coleção de antígenos de referência acrescida de 9 estirpes autóctones do Brasil

*** Coleção de antígenos de referência acrescida de estirpes autóctones e os isolados Unesp01 e Unesp05.

Muitas vezes o isolamento não é possível, tendo que se lançar mão apenas dos testes sorológicos. Quando não é possível utilizar técnicas diretas, a utilização de uma coleção de isolados locais aumenta a sensibilidade do teste, demonstrando que os métodos diretos e indiretos se completam e cada um tem seu espaço para compreensão da epidemiologia da infecção.

Conclusão

Diante dos dados obtidos no trabalho, houve êxito no isolamento bacteriológico a partir da urina de suínos, clinicamente saudáveis, abatidos no Estado de São Paulo, e foi possível caracterizar os isolados como pertencentes à espécie *Leptospira interrogans*, sorovares Icterohaemorrhagiae/Copenhageni, sorogrupo Icterohaemorrhagiae. A pesquisa destacou a importância epidemiológica do suíno na disseminação da doença e o risco para a saúde pública, por se tratar do sorogrupo mais encontrado em casos de leptospirose humana.

Referências

Ahmed N, Devi SM, Valverde MdeL, Vijayachari P, Machang'u RS, Ellis WA, Hartskeerl RA (2006) Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials** 5: 28(1-10).

Aleixo NCR, Neto JLS (2010) Eventos pluviométricos extremos e saúde: perspectivas de interação pelos casos de leptospirose em ambiente urbano. **HYGEIA** 6(11): 118-132.

Bolin CA (1996) Diagnosis of leptospirosis: A reemerging disease of companion animals. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)** 11: 166-171.

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. Acesso em: 12 abr. 2015.

Brasil - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (2017) **AGROSTAT - Estatísticas de Comércio Exterior do Agronegócio Brasileiro**. Disponível em: <http://indicadores.agricultura.gov.br/index.htm>. Acesso em: 15 fev. 2018.

CEMTEC - Centro de Monitoramento de Tempo, do Clima e dos Recursos Hídricos de Mato Grosso do Sul (2016) **Banco de Dados 2016**. Disponível em: http://www.cemtec.ms.gov.br/?page_id=15; 2018. Acesso em: 11 mar. 2018.

CLIMA-DATA.ORG (2016) **Tabela Climática 2016**. Disponível em: <https://pt.climate-data.org/location/34953/>; 2016. Acesso em: 11 mar. 2018.

Ellis WA (1992) Leptospirosis in pigs. **Pig Veterinary Journal**, Malmesbury 28: 24–34.

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

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

Faine S, Adler B, Boein C, Perolat P (1999) **Leptospira and Leptospirosis**. MedSci. Melbourne: Australia, 2. ed. 295 p.

Fenner JS, Anjum MF, Randall LP, Pritchard GC, Wu G, Errington J, Dalley CG, Woodward MJ (2010) Analysis of 16S rDNA sequences from pathogenic *Leptospira* serovars and use of single nucleotide polymorphisms for rapid speciation by D-HPLC. **Research in Veterinary Science** 89(1): 48-57.

Galloway RL, Levett PN (2010) Application and validation of pfge for serovar identification of *leptospira* clinical isolates. **PLOS Neglected Tropical Diseases** 4(9): e824.

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

Homem VSF, Heinemann MB, Moraes ZMM, Silvio Arruda 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.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2017) Indicadores - **Estatística da Produção Pecuária junho de 2017**. Disponível em: ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Fasciculo_Indicadores_IBGE/abate-leite-couro-ovos_201701caderno.pdf. Acesso em: 15 fev. 2018.

Ko AI, Galvão RM, Ribeiro Dourado CM, Johnson WD, Riley LW (1999) Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. **Lancet** 354: 820-825.

Majed Z, Bellenger E, Postic D, Pourcel C, Baranton G, Picardeau M (2005) Identification of variable-number tandem-repeat loci in *Leptospira interrogans* sensu stricto. **Journal of Clinical Microbiology** 43(2): 539-45.

Mathias JN, Ricaldi M, Cespedes MM, Diaz RL, Galloway. (2008) Human leptospirosis caused by a new, antigenically unique *Leptospira* associated with a *Rattus* species reservoir in the Peruvian Amazon. **PLOS Neglected Tropical Diseases** 2: e213.

McBride AJ, Athanazio DA, Reis MG, Mitermayer G; Ko, AI (2005) Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases** 18(5): 376–386.

Miraglia F, Moraes ZM, Melville PA, Dias RA, Vasconcellos SA (2009) EMJH medium with 5-fluorouracil and nalidixic acid associated with serial dilution technique used to recover *Leptospira* spp from experimentally contaminated bovine semen. **Brazilian Journal of Microbiology** 40: 189-193.

OIE - World Organisation for Animal Health (2014a) **Listed Diseases, Infections and Infestations in Force**. Disponível em: <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2014>. Acesso em: 14 abr. 2017.

OIE - World Organisation for Animal Health (2014b) **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Leptospirosis**. Disponível em: <http://www.oie.int/manual-of-diagnostic-tests-and-vaccines-for-terrestrial-animals>. Acesso em: 10 jan. 2018.

Oliveira PAV (2003) Produção e manejo de dejetos de suínos. Concórdia: Embrapa, 2003. 83 p. Disponível em: <http://www.cnpesa.embrapa.br/pnma/pdf_doc/8-PauloArmando_Producao.pdf>. Acesso em: 16 out. 2018.

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

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.

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.

Soto FRM, Vasconcellos SA, Pinheiro SR, F. Bernarsi F, Camargo SR (2007) Artigo de revisão: Leptospirose suína. **Arquivos 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 K, Lunn KF, G.E. 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.

Thiermann AB (1984) Isolation of leptospires in diagnosis of leptospirosis. **Modern Veterinary Practice** 5(10): 758- 759.

Vasconcellos SA (1987) O papel dos reservatórios na manutenção da leptospirose na natureza. **Comunicações científicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo** 11: 17-24.

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology** 73(2): 697-703.

CAPÍTULO 3 - Isolamento e caracterização de um novo genótipo de *Leptospira interrogans* sorogrupo Autumnalis de suínos abatidos no Estado de São Paulo

Resumo - A leptospirose é uma doença infecciosa cosmopolita, endêmica no Brasil, com potencial de acometer seres humanos e diferentes espécies animais, sendo responsável por prejuízos econômicos e sanitários. Para melhor compreensão da epidemiologia da doença e utilização de formas mais efetivas de controle, a realização de investigações epidemiológicas se faz necessária. O objetivo do trabalho foi isolar e realizar caracterização sorológica e molecular de *Leptospira* spp. de suínos abatidos no Estado de São Paulo. Foram coletadas 228 amostras de sangue, 150 amostras de urina e doze amostras de tecidos renais de suínos adultos, clinicamente saudáveis, oriundos de granjas de Mogi Mirim - SP e Nova Santa Rosa - PR, abatidos em matadouros-frigoríficos localizados na Mesorregião de Ribeirão Preto no Estado de São Paulo, nos meses de março e abril de 2016, respectivamente. Para o diagnóstico sorológico foi utilizada a técnica de soraglutinação microscópica (MAT) com uma coleção de antígenos de 35 sorovares, sendo 24 de referência e onze sorovares autóctones. As amostras de urina e rim foram semeadas em meios de cultivo Fletcher e EMJH e incubadas em estufa tipo B.O.D a $29\pm 1^\circ\text{C}$, por até 24 semanas. Para confirmação e caracterização das amostras foram realizadas as técnicas de sorogrupagem, PCR convencional para detecção de leptospirose patogênicas (utilizando como alvo genético o gene *lipL32*), genotipagem por VNTR, e sequenciamento nucleotídico dos genes *rrs* e *secY*. Pela técnica de MAT, 41,66% (95/228) das amostras foram positivas, apresentando como sorogrupos mais prováveis Autumnalis, Australis, Icterohaemorrhagiae, Pyrogenes, Djasiman e Sejroe. Foi possível obter o isolamento bacteriano a partir de duas amostras: tecido renal (Unesp02) e urina (Unesp04). Ambas foram sorogrupadas como pertencentes ao sorogrupo Autumnalis, apresentando os títulos de 51.200 e de 25.600, respectivamente. A determinação da espécie de *Leptospira* por meio de sequenciamento nucleotídico do gene *rrs* e *secY* demonstrou 100% de similaridade com sequências de referência de *L. interrogans*. A genotipagem pela técnica de VNTR demonstrou pertencerem a um ST (tipo de

sequência) ainda não descrito para o sorovar Autumnalis (VNTR4 = 2; VNTR7 = 19; VNTR10 = 12). O isolamento em tecido renal e em urina de uma estirpe de leptospiros com sequências distintas das anteriormente isoladas, e em um animal não considerado seu reservatório, sugere uma possível mudança no perfil epidemiológico da leptospirose.

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

Introdução

A leptospirose é uma doença infecciosa bacteriana causada por uma espiroqueta (Bharti et al., 2003), sendo a espécie que mais se destaca a *Leptospira interrogans*, patogênica para humanos e animais, com potencial de acometer uma ampla variedade de espécies, tanto selvagens quanto domésticas (WHO, 2003), com capacidade de promover quadros infecciosos e grandes perdas econômicas (Almeida et al., 1994). É uma das mais importantes zoonoses do mundo (Picardeau et al., 2014), cosmopolita, encontrada principalmente em países tropicais como o Brasil (Evangelista e Coburn 2010; Galloway e Levett 2010). Gera significativos problemas de saúde pública nas zonas rurais e urbanas, por ser uma doença que tem estreita relação com a interação dos humanos, animais e ecossistemas, representando bem o conceito de “saúde única” (FAO-OIE-WHO, 2010).

Geralmente de caráter ocupacional, representa risco principalmente para médicos veterinários, magarefes e funcionários da área rural, como os que trabalham em granjas suínas, que estão propensos a ter contato com o agente etiológico, de forma direta ou indireta, dado o manejo constante com os animais (Farr, 1995). A *Leptospira* possui, também, a capacidade de sobreviver no ambiente, mantendo-se viável por um longo período (Gonçalves-de-Albuquerque, 2012), fator que, após mudanças no panorama da sociedade e crescimento desordenado de áreas urbanas, com precariedade nos serviços de saneamento e presença de animais sinantrópicos, fez que a doença, antes apenas de área rural, conseguisse se manter presente em diferentes áreas, rurais e urbanas (Aleixo e

Sant'anna Neto, 2010). Esse dado é preocupante, principalmente nos períodos com maior índice pluviométrico, uma vez que áreas com estrutura deficitária ficam propensas a transbordamentos de rios, córregos e muitas vezes esgoto, o que pode levar a inundações; esse período é o de maior número de fatores ambientais propícios para disseminação da *Leptospira*, fato ressaltado pelo aumento de número de casos da doença nessas situações (Confaloniere, 2007).

Em geral, a infecção pode acontecer em qualquer fase da vida do animal ou do homem, nas formas grave, subclínica ou assintomática, podendo dar origem ao estado de portador renal (Faine et al., 1999). A transmissão ocorre de forma direta ou indireta, pelo contato da pele ou mucosa com órgãos e excreções com a presença da *Leptospira*, ou pelo solo, água e/ou fômites contaminados com a urina de animais doentes (Gonçalves-de-Albuquerque et al., 2012).

Diante da importância dessa doença, o diagnóstico é fundamental para que se possa fazer o tratamento específico nos animais doentes e para ter conhecimento se a bactéria está presente no ambiente e, se sim, quais sorogrupos, para, com o domínio dessas informações, ter êxito em programas sanitários de controle da doença (Limmathurotsakul et al., 2012).

O teste de soroaglutinação microscópica, é um diagnóstico sorológico, que para fornecer resultados mais fidedignos deve ser baseado no conhecimento local sobre sorovares circulantes ou com uma coleção de antígenos ampla para cobrir todos os sorogrupos patogênicos (Agampodi et al., 2014). Para ter uma coleção com antígenos locais é necessário isolamento e identificação das culturas, no entanto o isolamento é um desafio devido ao uso constante de antibióticos de amplo espectro (Nalam et al., 2010), além disso a *Leptospira* tem multiplicação lenta e difícil (Levett, 2001).

Com as mudanças climáticas, dos sistemas ecológicos e da forma de interação entre animais e humanos, cada vez mais próxima, o perfil das leptospiros também pode estar mudando, tanto no que diz respeito aos sorovares que estão circulando, como quanto à forma em que cada um se apresenta, podendo ter alterações em seu perfil genético (Naotunna et al., 2016). Desta maneira, é necessário, mesmo com as dificuldades, investigar as leptospiros presentes no ambiente, pelo uso de cultura e isolamento (Ahmed et al., 2006)

Visando essa necessidade, o objetivo do trabalho foi isolar e realizar caracterização sorológica e molecular de *Leptospira* spp. em suínos abatidos no Estado de São Paulo.

Material e Métodos

Local do estudo

A suinocultura paulista é constituída, principalmente, por produtores independentes, normalmente fora de sistemas de integração. Dessa forma, os abatedouros do Estado recebem suínos de várias propriedades e regiões. No presente estudo, foram coletadas 228 amostras de sangue, 150 amostras de urina e doze tecidos renais de suínos adultos, clinicamente saudáveis, oriundos de granjas de Mogi Mirim - SP e Nova Santa Rosa - PR, abatidos em matadouros-frigoríficos localizados na Mesorregião de Ribeirão Preto no Estado de São Paulo, nos meses de março e abril de 2016, respectivamente.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Câmpus de Jaboticabal/Unesp – SP, Brasil, sob N°12276/15, por estar dentro dos princípios éticos na experimentação animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e seguir os princípios dos três erres, descrito por Russell e Burch (1959), evitando o uso de animais sencientes exclusivamente para o trabalho, pois as amostras foram provenientes de animais que já seriam abatidos, sem nenhum tipo de influência na escolha dos animais ou da propriedade, seguindo a rotina do estabelecimento.

Foram coletadas amostras de sangue de todos os animais abatidos nos dias de coleta, e urina daqueles cuja bexiga permaneceu íntegra ao final da evisceração, assim como os rins que não haviam sido cortados, contaminados com fluidos estomacais ou perdido a membrana verdadeira.

O número do documento oficial para transporte de animal no Brasil, Guia de Trânsito Animal (GTA), foi anotado, assim como os demais dados relevantes descritos nele, para posteriormente ser possível o contato com o proprietário para realização de um questionário epidemiológico.

Colheita do material

As amostras de sangue foram coletadas no momento da sangria na linha de abate, em tubos descartáveis de coleta de sangue sem anticoagulante ou algum tipo de aditivo. Imediatamente após a coleta, o sangue foi mantido em temperatura ambiente até a retração do coágulo, posteriormente o soro foi transferido para microtubos e estocado a -20°C até a realização dos testes sorológicos.

As amostras de urina foram coletadas por cistocentese na linha de abate, na quantidade de 5 a 10 mL/animal, com auxílio de seringas esterilizadas. Os rins foram colhidos durante a fase de evisceração, armazenados individualmente em sacos de polipropileno esterilizados. No primeiro momento, a urina foi armazenada em temperatura ambiente, e os rins em caixa isotérmica contendo gelo para manutenção da temperatura entre 2°C e 8°C, para, em condições assépticas, serem semeados no meio de cultivo.

Isolamento de *Leptospira* spp. de urina e de tecido renal

De cada rim coletado foi retirado um fragmento de aproximadamente 3 cm³ da região do parênquima renal. Cada fragmento de tecido renal foi colocado dentro de coletor universal esterilizado, triturado, e adicionados 10 mL de salina. O conteúdo foi homogeneizado e deixado por uma hora em repouso, com o intuito de separar o sobrenadante do precipitado. O sobrenadante foi coletado com o auxílio de uma seringa descartável esterilizada e acoplada a um filtro de 0,22 µm (filtro de seringa KASVI, k18-230, PES membrane, Max.Pressure: 4,5 bars), assim com a urina.

Por amostra foram utilizados dois tubos de meios de cultura: um contendo meio de cultura semissólido, Fletcher, e outro com meio líquido, EMJH (Thiermann, 1984; Ellis et al., 1982), inicialmente com antibiótico 5-fluorouracil e ácido nalidíxico (Miraglia et al., 2009) contendo 10 mL de meio cada. Por tubo foram inoculadas aproximadamente cinco gotas de filtrado, e após 24 horas foi realizado um repique, do meio com antibiótico para um meio sem antibiótico, tendo como inóculo 10% do volume do meio a semear. Os tubos foram armazenados em estufa tipo B.O.D. a

29°C $\pm$ 1°C e examinadas visualmente e em microscopia de campo escuro semanalmente, por até 24 semanas.

Durante esse período, as amostras que apresentaram anel de opalescência ou nuvem de multiplicação foram separadas e sua pureza avaliada. Nos casos em que havia contaminação, foi feito o repique para um tubo contendo o mesmo tipo de meio da amostra suspeita (Fletcher ou EMJH) com antibiótico 5-fluorouracil e ácido nalidíxico (Miraglia et al., 2009) e após 24 horas a mesma amostra foi repicada em meio sem antibiótico (Thiermann, 1984; Ellis et al., 1982), e o processo foi repetido semanalmente até obter suspeitos sem contaminantes.

Dos meios com suspeita de multiplicação de *Leptospira* spp. foi retirada uma alíquota para observação em microscopia de campo escuro com objetiva de 10x (Faine, 1994). Quando observada multiplicação bacteriana semelhante a uma espiroqueta, um repique foi feito em meio Fletcher e EMJH sem antibiotico, para utilização nas análises moleculares.

Sorogrupagem

Todos os isolados obtidos foram testados contra 32 antissoros (Andamana, Bratislava, Australis, Autumnalis, Castellonis, Bataviae, Canicola, Celledoni, Codice, Cynopteri, Djasiman, Grippotyphosa, Hebdomadis, Holland, Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Lousiana, Lyme, Manhao, Mini, Panama, Pomona, Pyrogenes, Pinchang, Sarmin, Hardjoprajitno, Hardjobovis, Wolffi, Patoc, Shermani e Tarassovi), correspondentes a 28 sorogrupos (Andamana, Australis, Autumnalis, Ballum, Bataviae, Canicola, Celledoni, Codice, Cynopteri, Djasiman, Grippotyphosa, Hebdomadis, Holland, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Lousiana, Lyme, Manhao, Mini, Panama, Pomona, Pyrogenes, Ranarum, Sarmin, Sejroe, Semaranga, Shermani e Tarassovi), fornecidos pelo Royal Tropical Institute (KIT, Amsterdã), de acordo com Faine e colaboradores (1999).

Extração de DNA e reação em cadeia da polimerase

Culturas de *Leptospira* spp. com multiplicação bacteriana entre 10^7 e 10^8 células por mL foram submetidas a extração de DNA com Wizard SV Genomic DNA Purification System® (Promega) conforme instruções do fabricante.

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional para detecção de leptospiros patogênicos teve como alvo genético o gene *lipL32*. Os primers utilizados foram LipL32-45F (5'-AAG CAT TAC CGC TTG TGG TG-3') e LipL32-286R (5'-GAA CTC CCA TTT CAG CGA TT-3') (Stoddard et al., 2009). A reação foi realizada com volume final de 25 µL, buffer 10x, 2,5 mM de MgCl₂, 0,6 picomol de cada primer, 25 mM de dNTPs, 1 U de GoTaq® DNA Polymerase (Promega) e 30 ng de DNA. O programa de temperaturas incluiu uma desnaturação inicial de 94°C por dois minutos, seguida de quarenta ciclos de 94°C por trinta segundos, 53°C por trinta segundos, 72°C por um minuto, e extensão final de cinco minutos a 72°C.

A determinação da espécie de *Leptospira* foi realizada por meio de PCR e sequenciamento nucleotídico dos genes *rrs* (16S rRNA) e *secY*. Os primers utilizados para a amplificação do 16S foram 16S fD1 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' e 16S rP2 5'-ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT-3' (Weisburg et al., 1991). A reação foi realizada com volume final de 25 µL, buffer 10x, 2,0 mM de MgCl₂, 0,6 picomol de cada primer, 25 mM de dNTPs, 0,5 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e 30 ng de DNA. O programa de temperaturas incluiu uma desnaturação inicial de 95°C por cinco minutos, seguida de 35 ciclos de 95°C por dois minutos, 42°C por trinta segundos, 72°C durante três minutos, e extensão final de dez minutos a 72°C. Os primers utilizados para a amplificação do *secY* foram *secY* F 5'-ATG CCG ATC ATT TTT GCT TC-3' e *secY* R 5'-CCG TCC CTT AAT TTT AGA CTT CTT C-3' (Ahmed et al., 2006). A reação foi realizada com volume final de 25 µL, buffer 10x, 1,5 mM de MgCl₂, 0,6 picomol de cada primer, 25 mM de dNTPs, 0,5 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e 30 ng de DNA. O programa de temperaturas incluiu: uma desnaturação inicial de 95°C por cinco minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos, 72°C por um minuto, e extensão final de sete minutos a 72°C.

A eletroforese em gel de agarose 1,5%, utilizando o corante GelRed (Invitrogen), foi realizada, e os resultados foram visualizados sob luz ultravioleta.

Foram incluídos controles negativos da extração e da PCR, além da estirpe Fiocruz L1-130 como controle positivo.

Sequenciamento nucleotídico

Os produtos de PCR foram purificados com GFX PCR DNA Gel Band Purification kit (GE HealthCare). A reação de sequenciamento nucleotídico foi realizada utilizando o BigDye Terminator v3.1 kit (Applied Biosystems). O sequenciamento nucleotídico do gene *rrs* incluiu a utilização de primers internos, Lepto16SF1 5'-GGC GGY GCT CTT WAW CAT-3' e Lepto16SR2 5'-ATC CCG TTC ACT ACC CAC GC-3' (Fenner et al., 2010), além dos anteriormente descritos. A eletroforese capilar foi realizada em um sequenciador automático ABI 3730 (Applied Biosystems).

Variable-Number Tandem-Repeat (VNTR)

A técnica do VNTR foi realizada na tentativa de genotipar as estirpes de *Leptospira* isoladas. O protocolo envolveu três alvos genéticos: VNTR4, VNTR7 e VNTR10, conforme (Majed et al 2005). A reação foi realizada com volume final de 25 µL, 10x de buffer, 1,5 mM de MgCl₂, 0,6 picomol de cada primer, 25 mM de dNTPs, 0,5 U de Taq polymerase (Amersham) e 30 ng de DNA. O programa de temperaturas incluiu uma desnaturação inicial de 94°C por cinco minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por trinta segundos, 55°C por trinta segundos, 72°C por um minuto e meio, e extensão final de 72°C por dez minutos. A eletroforese em gel de agarose 1,5%, utilizando o corante GelRed (Invitrogen), foi realizada, e os resultados foram visualizados sob luz ultravioleta. O número de repetições de cada alvo de VNTR foi calculado conforme Salaüm e colaboradores (2006).

Técnica de soroaglutinação microscópica (MAT)

Para a pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira* spp., foi utilizada a técnica de soroaglutinação microscópica (MAT), de acordo com a metodologia descrita pela OIE (2014). Foi utilizada uma coleção de 35 sorovares/ estirpes, sendo 24 sorovares de referência (Andamana, Australis, Bratislava, Autumnalis, Butembo,

Castellonis, Bataviae, Canicola, Whitcombi, Cynopteri, Sentot, Grippotyphosa, Hebdomadis, Copenhageni, Icterohemorrhagiae, Javanica, Panama, Pomona, Pyrogenes, Hardjo, Wolffi, Patoc, Shermani, Tarassovi) e 11 sorovares autóctones (Guaricura, Goiano, LO10, LO04, GR6, 2A-CAP, Brasiliensis, 110/06, LO14 Unesp02 e Unesp04), tabela 01. As amostras reagentes na diluição inicial foram testadas em diluições seriadas de razão dois, sendo a primeira diluição 1/100, conforme a recomendação da OIE (2014).

Tabela 1. Estirpes de leptospiros autóctones isoladas no Brasil, segundo sorovar, sorogrupo, espécie e animal de origem.

Estirpe	Sorovar	Sorogrupo	Especie	Animal
Guaicurus	Guaricura	Sejroe	<i>L. santarosai</i>	Búfalo
Goiano	Goiano	Hebdomadis	<i>L. interrogans</i>	Bovino
LO10	Copenhageni	Icterohaemorrhagiae	<i>L. interrogans</i>	Bovino
LO4	Canicola	Canicola	<i>L. interrogans</i>	Suíno
GR6	Pomona	Pomona	<i>L. interrogans</i>	Suíno
2A – CAP	Bananal	Grippotyphosa	<i>L. santarosai</i>	Capivara
BRA	Brasiliensis	Bataviae	<i>L. santarosai</i>	Gambá
110/06	-	Pomona	<i>L. kirschneri</i>	Cachorro do Mato
LO14	Canicola	Canicola	<i>L. interrogans</i>	Canino
Unesp02	Autumnalis	Autumnalis	<i>L. interrogans</i>	Suíno
Unesp04	Autumnalis	Autumnalis	<i>L. interrogans</i>	Suíno

Resultados

Foi possível obter o isolamento bacteriano a partir de duas amostras: uma de tecido renal (Unesp02) e uma de urina (Unesp04), após um intervalo de tempo da coleta do material ao isolamento de três e quatro meses, respectivamente. Das 160 amostras de urina e tecido renal restantes, nove contaminaram, sem êxito nos processos de descontaminação; e 151 não desenvolveram nenhum tipo de multiplicação bacteriana.

Os isolados foram sorogrupoados como pertencentes ao sorogrupo Autumnalis, apresentando os títulos de 51.200 e de 25.600, respectivamente. Foram positivas na reação de PCR convencional para detecção de leptospiros patogênicos, utilizando como alvo genético o gene *lipL32*.

A determinação da espécie de *Leptospira* por meio de sequenciamento nucleotídico do gene *rrs* demonstrou 100% de similaridade com sequência de referência de *L. interrogans*. O sequenciamento nucleotídico do gene *secY* permitiu a confirmação dos isolados como *L. interrogans*. As sequências dos isolados

Unesp02 e Unesp04 foram registradas no GenBank, com os números de acesso para o gene-alvo *rrs*: MH686121 e MH686122, respectivamente, e para o gene-alvo *secY* os números de acesso: MH683047 e MH683048, respectivamente.

A genotipagem pela técnica de VNTR demonstrou pertencerem a um ST (tipo de sequência) ainda não descrito para o sorovar *Autumnalis* (VNTR4 = 2; VNTR7 = 19; VNTR10 = 12).

Para avaliação soroepidemiológica foi realizada a técnica de MAT, que obteve 41,66% (95/228) das amostras positivas, reagentes a 45,7% (16/35) dos sorovares testados (Tabela 2), apresentando como sorogrupos mais prováveis *Autumnalis*, *Australis*, *Canicola*, *Icterohaemorrhagiae*, *Pyrogenes*, *Sejroe*, *Semaranga* e *Sentot*, e em 16 amostras não foi estabelecido o sorovar/sorogrupo mais provável, por não estarem dentro dos critérios da avaliação.

Após a realização do MAT e o êxito no isolamento, com as informações adquiridas no GTA foram contactados os responsáveis pelas granjas aplicando um questionário epidemiológico, adquirindo informações relevantes para auxiliar na compreensão dos resultados encontrados. A granja do município de Nova Santa Rosa é familiar, contanto com área de 10 hectares, tendo como a única fonte de renda a suinocultura. Existe a presença de outras espécies, como um equinos e dois cães na propriedade, além da observação da presença de animais selvagens e sinantrópicos, cujas espécies o proprietário não soube identificar. Na rotina da propriedade, os animais recebem vacinação contra parvovirose e leptospirose, no entanto o proprietário não soube especificar o período, nem qual vacina ou composição utilizada. O proprietário relatou a presença de cercas em volta da granja e presença veterinária uma vez por semana, não tendo perdas fora do esperado ou por alguma causa em especial.

Já a granja do município de Mogi Mirim tem como renda, além da suinocultura, a produção de limão e abacate, dividindo a área da propriedade de 48 hectares em 13 hectares voltados à suinocultura, 30 hectares de pomar e área verde, além de 5 de áreas construídas. Como espécies animais presentes na propriedade, relatou que, além dos suínos, tem seis equinos e dois cães, além da presença de animais selvagens e sinantrópicos. Com relação às condutas tomadas na propriedade, os animais são vacinados contra parvovirose, leptospirose e

erisipela. Assim como o proprietário da granja do Paraná, o proprietário não soube relatar o período, nem a composição ou produto utilizado, pois troca constantemente, dependendo do custo. A propriedade tem presença de médico veterinário e zootecnista diariamente, filhos do proprietário, responsáveis pela granja.

Nenhuma das propriedades disponibilizou a localização, latitude e longitude, da propriedade. Apesar de os dois proprietários demonstrarem conhecimentos sobre zoonoses, nenhum soube explicar como ocorria a transmissão ou a prevenção da leptospirose. Em relação à estrutura das granjas, nenhuma tem biodigestor ou tratamento dos dejetos dos animais.

Tabela 2. Sorogrupo, Sorovar e número (nº) de reações para cada título de aglutininas de 95 suínos sororreagentes pelo teste de soroaglutinação microscópica, a uma ou mais das 35 sorovariedades de *Leptospira* spp, entre 228 suínos, abatidos nos meses de março e abril de 2016, na Mesorregião de Ribeirão Preto, 2016.

Sorogrupo/Sorovar positivos		Mês da coleta								
Sorogrupo	Sorovar	Março				Abril				
		Título			MP	Título			MP	TMP
		100	200	400		100	200	400		
		nº	nº	nº	nº	nº	nº	nº	nº	nº
Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	1	0	0	0	1	0	0	1	1
	Lo10	2	0	0	0	1	0	0	0	0
	Icterohaemorrhagiae	26	10	1	27	6	0	0	0	27
Sejroe	Hardio	1	0	0	0	1	0	0	0	0
	Wolffi	7	3	0	5	1	1	0	0	5
	Guaicura	4	0	0	1	0	0	0	0	1
Autumnalis	Autumnalis	1	3	0	4	0	0	0	0	4
	Unesp02	5	1	0	0	0	1	0	1	1
	Unesp04	1	1	0	0	0	0	0	0	0
Australis	Bratislava	1	0	0	0	26	3	1	22	22
Semarang	Patoc	0	1	0	1	10	4	0	9	10
Pyrogeneses	Pyrogeneses	5	1	0	2	0	0	1	1	3
Canicola	Lo04	4	1	0	3	0	0	0	0	3
Sentot	Sentot	3	0	0	2	0	0	0	0	2
Panama	Panama	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Não identificado	110/06	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Total		45				34				79
Sem sorovar/sorogrupo mais provável		10				6				16
Total de amostras reagentes		55				46				95

MP = nº de vezes em que o sorovar/sorogrupo apareceu como o mais provável por mês de coleta.
 TMP = nº total de vezes em que o sorovar/ sorogrupo apareceu como o mais provável.

Discussão

A presença de anticorpos anti-leptospira em amostras sorológicas colhidas de animais de abatedouro não representa uma amostragem adequada para o estudo da prevalência da leptospirose suína em uma determinada região, mas permite que se tenha uma noção geral da sua ocorrência e pode sugerir quais os sorovares de *Leptospira* spp. possuem maior importância na região de origem dos animais (Shimabukuro et al., 2003)

No MAT o presente trabalho encontrou 41,66% de animais sororreagentes, valor superior ao encontrado anteriormente no Estado em levantamentos sorológicos de suínos realizado por Langoni e colaboradores em 1995, que observaram 27,3% de animais positivos, no entanto, é semelhante ao encontrado no Estado de São Paulo em 2003, com 36,6% (Shimabukuro et al. 2003).

Na sorologia, os sorovares reagentes para *Icterohaemorrhagiae* e Bratislava se destacaram, sendo que em 22 e 27 amostras, respectivamente, estes sorovares se apresentaram como os mais prováveis. O sorovar *Icterohaemorrhagiae* foi o de maior número de amostras reagentes, 28,45% (27/95) dentre as positivas. Favero e colaboradores (2002) e Shimabukuro e colaboradores (2003) também observaram esse sorovar como o mais presente na suinocultura, fato correlacionado com a presença dos principais reservatórios, os roedores sinatrópicos, nas granjas de suínos, indicando a importância desses animais como prováveis fontes de infecção nas criações de suínos. Os ratos também são reservatórios de outros sorogrupos, como o *Autumnalis* (Shimabukuro et al., 2003), isolado no presente trabalho. Já para o sorovar Bratislava 23,15% (22/95) das amostras foram reagentes na análise.

Os isolamentos obtidos em meio de cultura, Fletcher, confirmam a presença de leptospiros viáveis em rim e urina de suínos, aparentemente saudáveis, no momento do abate. As amostras foram colhidas em dois abatedouros do Estado de São Paulo, demonstrando o risco para os profissionais que lidam diretamente com os animais, secreções e (ou) órgãos, muitas vezes sem equipamentos de proteção pessoal adequados. Tal risco já foi relatado em diferentes países da América do Sul, do Norte e Oceania (Zamora et al., 1988; Baker et al., 1989; Bolt e Marshall, 1995).

Apesar de as amostras serem coletadas no Estado de São Paulo, os isolados foram obtidos de animais criados em dois estados diferentes: São Paulo e Paraná, demonstrando a importância desse sorovar para regiões distintas, sudeste e sul. Os estados têm área limítrofe, com distância entre as cidades de origem dos animais de 926 km. Apesar de terem sido isoladas de granjas e regiões diferentes, as estirpes demonstraram o mesmo genótipo, ainda não descrito.

No município de Nova Santa Rosa, de acordo com a Secretaria do Meio Ambiente e Recursos Hídricos do Estado do Paraná (2018), registrou-se um índice pluviométrico, no mês de abril, de 76,3 mm, com média dos últimos seis meses de

107,16 mm. Ness mês, houve notificação no Sistema de Informações de Agravos de Notificação (SINAN) de 38 casos de leptospirose humana, com 352 casos notificados nos últimos seis meses, no Estado do Paraná, sendo 39 na região Oeste, região da qual o município faz parte.

Mesmo o mês de abril não sendo um dos mais importantes com relação aos índices pluviométricos, por ser um dos três meses do ano com menor precipitação, foi o 4º mês com maior número de casos no estado e o mês com o maior número de casos na região Oeste (SINAN, 2018). O número elevado de casos pode ser devido ao alto índice pluviométrico nos meses anteriores, que auxilia na disseminação da leptospira no ambiente e aumenta a possibilidade de um hospedeiro entrar em contato. O município tem a vegetação de Floresta Semitecidual Densa, com clima subtropical úmido mesotérmico e hidrografia formada por dois rios e oito microbacias (Nova Santa Rosa, 2018), o clima encontrado no município, de acordo com classificação climática de Köppen-Geiger, não tem estação seca (Kottek et al., 2006), fato que, associado a vegetação e hidrografia local, contribui para a manutenção da umidade do ar e do solo, características que auxiliam na manutenção da *Leptospira* viável no meio (Okazaki e Ringer, 1957).

Já no município de Mogi Mirim, no mês de março, houve dezesseis dias de chuva, totalizando 155,0 mm, e a média dos últimos seis meses foi de 182,7 mm, período de chuvas intensas (CIIAGRO, 2018). O mês de aquisição do material que deu origem ao isolado teve 111 casos notificados no estado no SINAN, e 352 nos últimos seis meses, sendo vinte na macrorregião de Campinas, da qual o município faz parte. Nesse mês também se observou o maior número de notificações na região, 16 dos 20 notificados, no ano de 2016 (SINAN, 2018). A vegetação é de cerrado, com base em latossolo, e clima quente e temperado. A bacia hidrografia é formada pelo rio Mogi Guaçu e pelo córrego Lamedouro (Mogi Mirim, 2018). O solo, apesar de ser rico em minerais e argiloso, é capaz de abrigar uma vasta quantidade de microrganismos, em especial bactérias (Whitman et al., 1998), fato que, associado a um intenso período de chuvas, pode favorecer a manutenção da *Leptospira* no ambiente.

Apesar de o isolamento ter sido obtido de amostras de municípios com geografia, clima e vegetais diferentes, nos meses em que ocorreu a coleta dos

materiais que deram origem aos isolados, os municípios de origem dos animais notificaram um número elevado de casos em humanos, comparado ao dos demais meses no ano, mostrando a importância de entender a epidemiologia da leptospirose, no conceito de saúde única, associando os dados de isolamento em animais da região com os dados de notificação humana, com o intuito de entender melhor como se dá a doença na região e desta forma tentar elaborar planos de ação efetivos para controle e prevenção da doença.

As duas granjas nas quais se obtiveram isolados tinham em comum a presença de equinos, cães, roedores e animais selvagens sem identificação da espécie, dados relevantes quanto ao ciclo epidemiológico deste sorovar, visto que nessas espécies o sorovar Autumnalis vem apresentando importância, já tendo sido isolado de animais selvagens, como o guaxinin, no sul dos Estados Unidos, espécie relatada como reservatório natural do sorovar (McKeever et al., 1958). Além das espécies selvagens, foi isolado de animais domésticos, cães, que foram a óbito com sinais típicos da forma aguda da leptospirose (Sonrier et al., 2000). Assim como no presente trabalho, Shimabukuro e colaboradores (2003) isolaram estirpes de amostra renal de suínos abatidos no Estado de São Paulo, no entanto a tipificação não foi realizada, apenas sorologia, que indicou que o isolado pertencia ao sorogrupo Autumnalis.

O que difere o isolado do presente trabalho de outros já descritos na literatura é que estes, unesp02 e unesp04, apresentam um genótipo ainda não descrito, demonstrando mudança no perfil genético deste sorovar, o que pode acarretar mudanças no comportamento e na adaptação da bactéria. Esses dados indicam que o agente etiológico tem capacidade de acometer espécies selvagens, domésticas e de produção, e de ser por essas espécies transmitido a outros animais. No caso dos suínos do presente estudo, não é possível determinar a fonte de infecção pois outros animais presentes nas granjas são susceptíveis à infecção, havendo na literatura a descrição de seu isolamento a partir de amostras de urina de cães e suínos. Nos equinos, apesar da ausência de descrição de isolamento, está entre os sorovares mais encontrados em inquéritos epidemiológicos, sendo descrito como um sorogrupo/sorovar importante, encontrado em exames sorológicos de animais com

uveíte recorrente, sinal clínico clássico da leptospirose nos equinos (Swart et al., 1982; Gilger e Deeg, 2011).

No sequenciamento nucleotídico do gene *rrs* os isolados demonstraram 100% de similaridade com sequência de referência de *L. interrogans* (GenBank, nº de acesso: CP013147), descrita por Llanes e colaboradores (2016), espécie confirmada pelo sequenciamento do gene *secY*, que demonstrou ser 100% similar com a sequência de *L. interrogans* (GenBank, nº de acesso: EU358000) descrita por Victoria e colaboradores (2008). O sorovar Autumnalis é considerado emergente ou reemergente no Brasil (Modolo et al., 2000; Aguiar et al., 2007).

Nos suínos, trabalhos de inquérito epidemiológico indicaram a importância deste sorovar em diferentes granjas pelo mundo (Boqvist et al., 2002), destacando-o entre os sorovares mais frequentes no Brasil (Gonçalves e Costa, 2011). Apesar de o suíno ser considerado um hospedeiro acidental deste sorogrupo (Ellis, 1992), o Autumnalis vem ganhando relevância, sendo necessárias novas avaliações diante do aparecimento de um novo genótipo.

Um fator que destaca a importância do estudo dos suínos na manutenção e disseminação do agente etiológico da leptospirose é que a atividade está em expansão e ainda não há um destino adequado de todos os dejetos e resíduos gerados, sendo esta a atividade agropecuária que ocasiona maior impacto ambiental (Rizzoni et al., 2012), e muitas vezes nem o manejo básico adequado dos resíduos é realizado (Williams, 2008). Os dejetos suínos são constituídos por fezes, urina, água desperdiçada pelos bebedouros e de higienização e outros materiais decorrentes do processo criatório (Rizzoni et al., 2012), material propício para a manutenção do agente no meio. Esses dejetos, muitas vezes, são lançados em corpos d'água, o que causa a poluição e contaminação dos recursos hídricos da região em torno da granja (Barbosa e Langer, 2011). Como as granjas do estudo não têm nenhum sistema de diminuição da emissão dos dejetos no ambiente, ou método de tratamento como biodigestores, tornam-se riscos não só para os colaboradores das granjas e magarefes, mas também para a população da região, existindo a possibilidade da continuação do ciclo epidemiológico da doença, tendo os suínos como fonte para outros animais e humanos.

Conclusão

O isolamento bacteriológico a partir de urina e amostra renal de suínos, clinicamente saudáveis, abatidos no Estado de São Paulo obteve êxito, demonstrando a importância epidemiológica do suíno na disseminação da doença.

Com as técnicas moleculares foi possível identificar dois isolados como *L. interrogans*, sorovar Autumnalis, do sorogrupo Autumnalis; sorogrupo também identificado na sorologia, presente entre os sorogrupos mais prováveis. As estirpes isoladas apresentam uma sequência nova, demonstrando uma possível evolução desse sorovar, necessitando de mais estudos para a compreensão da mudança que essa evolução gerou.

Referências

Agampodi SB, Dahanayaka NJ, Bandaranayaka AK, Perera M, Priyankara S, Weerawansa S, Matthias MA, Vinetz JM (2014) Regional differences of leptospirosis in Sri Lanka: Observations from a flood-associated outbreak in 2011. **PLOS Neglected Tropical Diseases** 8(1): e2626

Aguiar DM, Cavalcante GT, Marvulo MFV, Silva JCR, Pinter A, Vasconcellos SA, Moraes ZM, Labruna MB, Camargo LMA, Gennari SM (2007) Fatores de risco associados à ocorrência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em cães do município de Monte Negro, Rondônia, Amazônia Ocidental Brasileira. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 59(1): 70-76.

Ahmed N, Devi SM, Valverde MdeL, Vijayachari P, Machang'u RS, Ellis WA, Hartskeerl RA (2006) Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials** 5: 28(1-10).

Aleixo NCR, Sant'anna Neto JL (2010) Eventos pluviométricos extremos e saúde: perspectivas de interação pelos casos de leptospirose em ambiente urbano. **Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde** 6(11): 118-132.

Almeida LP, Martins LFS, Brod CS, Germano PML (1994) Levantamento soroepidemiológico de leptospirose em trabalhadores do serviço de saneamento ambiental em localidade urbana da região sul do Brasil. **Revista de Saúde Pública** 28(1): 76-81.

Azevedo SS, Fernandes ARF, Queiroga IMBN, Alves CJ, Moraes ZM, Santos CSAB, Vasconcellos SA (2011) Ocorrência e fatores de risco associados à leptospirose em cães atendidos em hospital veterinário no semiárido paraibano. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science** 48(2): 161-166.

Baker TF, McEwen SA, Prescott JF, Meek AH (1989) The prevalence of leptospirosis and its association with multifocal interstitial nephritis in swine at slaughter. **Canadian Journal of Veterinary Research** 53(3): 290-294.

Barbosa G, Langer M (2011) Uso de biodigestores em propriedades rurais: uma alternativa à sustentabilidade ambiental. **Unoesc & Ciência – ACSA** 2(1): 87-96.

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

Bolt I, Marshall RB (1995) The epidemiology of *Leptospira interrogans* serovar pomona in grower pig herds. **New Zealand Veterinary Journal** 43(1): 10-15.

Boqvist S, Thu HTV, Vågsholm I, Magnusson U (2002) The impact of *Leptospira* seropositivity on reproductive performance in sows in southern Viet Nam. **Theriogenology** 58(7): 1327-1335.

CIIAGRO - Centro integrado de informações agrometeorológicas (2018) Quadro de chuvas. Disponível em: <http://www.ciiagro.sp.gov.br/ciiagroonline/quadros/qchuvaperiodo.asp>. Acesso em: 10 abr. 2018.

Confalonieri UEC (2007) Mudança climática global e saúde: perspectivas para o Brasil. **Revista Multiciência** 8: 48-64.

Ellis WA (1992) Leptospirosis in pigs. **Pig Veterinary Journal** 28: 24–34.

Ellis WA, Neill SD, Brien JJO, Cassells JA, Hanna J (1982) Bovine leptospirosis: microbiological and serological findings in normal fetuses removed from the uteri after slaughter. **Veterinary Record** 110: 192–194.

Evangelista K, Coburn J (2010) *Leptospira* as an emerging pathogen: A review
 Faine S (1994) ***Leptospira* and leptospirosis**. CRC Press, Boca Raton, Florida, EUA, 353p.

Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P (1999) ***Leptospira* and Leptospirosis**. 2nd Edition, Medisci Press, Melbourne: Australia, 295 p.

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

FAO-OIE-WHO - Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO. World Organization for Animal Health – OIE. World Health Organization - WHO (2010) **The FAO-OIE-WHO Collaboration: Sharing Responsibilities and Coordinating Global Activities to Address Health Risks at the Animal-Human-Ecosystems Interfaces**. FAO, OIE, WHO; Geneva, Switzerland: 2010. pp. 1–8.

Farr RW (1995) Leptospirosis. **Clinical Infectious Diseases** 21: 1-6.

Favero ACM, Pinheiro SR, Vasconcellos SA, Moraes ZM, Ferreira F, Ferreira Neto JS (2002) Sorovares de leptospiras predominantes em exames sorológicos de bubalinos, ovinos, caprinos, eqüinos, suínos e cães de diversos estados brasileiros. **Ciência Rural** 32(4): 613-619.

Fenner JS, Anjum MF, Randall LP, Pritchard GC, Wu G, Errington J, Dalley CG, Woodward MJ (2010) Analysis of 16S rDNA sequences from pathogenic *Leptospira* serovars and use of single nucleotide polymorphisms for rapid speciation by D-HPLC. **Research in Veterinary Science** 89(1): 48-57.

Galloway R, Levett P (2010) Application and validation of PFGE for serovar identification of *Leptospira* clinical isolates. **PLOS Neglected Tropical Diseases** 4(9): e824.

Gamberini M, Gómez RM, Atzingen MV, Martins EA, Vasconcellos SA, Romero EC, Leite LC, Ho PL, Nascimento AL (2005) Whole-genome analysis of *Leptospira interrogans* to identify potential vaccine candidates against leptospirosis. **FEMS Microbiology Letters** 244: 305-313.

Gilger CB, Deeg C (2011). **Equine Recurrent Uveitis**. In Gilger B, Equine Ophthalmology (2nd edition). Saunders Elsevier 496p.

Larissa Maria Feitosa Gonçalves LMFG, Costa FAL (2011). Leptospiroses em suínos no Brasil. **Revista de Patologia ropical** 40 (1): 1-14.

Gonçalves-de-Albuquerque CF, Burth P, Silva AR, Younes-Ibrahim M, Castro-Faria-Neto HC, Castro-Faria MV (2012) *Leptospira* and inflammation. **Mediators of Inflammation** 2012: 1-11.

Higino SSS, Azevedo SS, Alves CJ, Figueiredo SM, Silva MLCR, Batista CSA (2010) Frequência de leptospirose em ovinos abatidos no Município de Patos, Paraíba. **Arquivos do Instituto Biológico** 77(3): 525-527.

Kottek M, Grieser J, Beck C, Rudolf B, Rubel F (2006) World Map of the Köppen-Geiger climate classification updated. **Meteorologische Zeitschrift** 15(3): 259-263.

Langoni H, Cabral KG, Silva AV, Baldini S (1995) Inquérito soroepidemiológico para leptospirose suína. 7º Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em suínos. **Resumos**. Blumenau – SC p.153.

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

Limmathurotsakul D, Turner EL, Wuthiekanun V, Thaipadungpanit J, Suputtamongkol Y, Chierakul W, Smythe LD, Day NP, Cooper B, Peacock SJ (2012) Fool's gold: Why imperfect reference tests are undermining the evaluation of novel diagnostics: A reevaluation of 5 diagnostic tests for leptospirosis. **Clinical Infectious Diseases** 55 (3): 322-331.

Llanes A, Restrepo CM, Rajeev S (2016) Whole Genome Sequencing Allows Better Understanding of the Evolutionary History of *Leptospira interrogans* Serovar Hardjo. **PLoS One** 11(7): e0159387.

Majed Z, Bellenger E, Postic D, Pourcel C, Baranton G, Picardeau M (2005) Identification of variable-number tandem-repeat loci in *Leptospira interrogans* sensu stricto. **Journal of Clinical Microbiology** 43(2): 539-45.

McKeever S, Gorman GW, Galton MM, Hall AD (1958) The raccoon, *Procyon lotor*, a natural host of *Leptospira* Autumnalis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 68: 13 - 4.

Miraglia F, Moraes ZM, Melville PA, Dias RA, Vasconcellos SA (2009) EMJH medium with 5-fluorouracil and nalidixic acid associated with serial dilution technique used to recover *Leptospira* spp from experimentally contaminated bovine semen. **Brazilian Journal of Microbiology** 40: 189-193.

Modolo JR, Berto DA, Langoni H, Gottschalk AF, Stachissini AVM, Sohesten AL (2000) Seroprevalence of *Leptospira interrogans* serovar Djasiman in quarantined pigs. **Indian Veterinary Journal** 77 (2): 155-156.

Mogi Mirin (2018) Prefeitura do Município de Mogi Mirin – Recursos Hídricos e territoriais. Disponível em: <http://www.mogimirim.sp.gov.br/acidade> Acesso em: 09 ago. 2018

Nalam K, Ahmed A, Devi SM, Francalacci P, Baig M, Sechi LA, Hartskeerl RA, Ahmed N (2010) Genetic affinities within a large global collection of pathogenic *Leptospira*: Implications for strain identification and molecular epidemiology. **PLoS One** 5(8): e12637.

Naotunna C, Agampodi SB, Agampodi TC (2016) Etiological agents causing leptospirosis in Sri Lanka: A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine** 9(4): 390-394.

Nova Santa Rosa (2018) Prefeitura do Município – **Perfil territorial de Nova Santa Rosa**. Disponível em: <http://novasantarosa.pr.gov.br/dadosgerais/> Acesso em: 09 ago. 2018.

OIE - World Organization for Animal Health (2014) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. **Leptospirosis**. Paris, 1404 p. Disponível em: <http://www.oie.int/manual-of-diagnostic-tests-and-vaccines-for-terrestrial-animals/> Acesso em: 10 jan. 2018.

Okazaki W, Ringen LM (1957) Some effects of various environmental conditions on the survival of *Leptospira* Pomona. **American Journal of Veterinary Research** 18: 219-223.

Picardeau M, Bertherat E, Jancloes M, Skouloudis AN, Durski K, Hartskeerl RA (2014) Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: Current tools and emerging technologies. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** 78: 1-8.

Rizzoni LB, Tobias ACT, Del Bianchi M, Garcia JAD (2012) Biodigestão anaeróbia no tratamento de dejetos de suínos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária** 9(18): 1-20.

Russell WMS, Burch RL (1959) (Reimpressão 1992). **The principles of humane experimental technique**. Wheathampstead (UK): Universities Federation for Animal Welfare.

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.

Secretaria do Meio Ambiente e Recursos Hídricos do Estado do Paraná (2018) **Índices de Precipitação Pluviométrica**. Disponível em: <http://www.aguasparana.pr.gov.br/pagina-264.html>. Acesso em: 09 ago. 2018.

Shimabukuro FH, Domingues PF, Langoni H, Silva AV, Pinheiro JP, Padovani CR (2003) Pesquisa de suínos portadores renais de leptospiros 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** 40: 243-253.

SINAN - Sistema de Informações de Agravos de Notificação (2018) **Leptospirose - Notificações** Registradas: banco de dados. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203&id=29878153> Acesso em: 05 ago. 2010.

Sonrier C, Branger C, Michel V, Ruvoën-Clouet N, Ganière JP, André-Fontaine G. (2000) Evidence of cross-protection within *Leptospira interrogans* in an experimental model. **Vaccine** 19: 86-94.

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.

Swart KS, Calvert K, Meney C (1982) The prevalence of antibodies to serovars of *Leptospira interrogans* in horses. **Australian Veterinary Journal** 59: 25-27.

Thiermann AB (1984) Isolation of leptospires in diagnosis of leptospirosis. **Modern Veterinary Practice** 5(10): 758- 759.

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(7): e2752.

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology** 73(2): 697-703.

Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ (1998) Prokaryote the unseen majority. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 95: 6578-83.

WHO - World Health Organization (2003). **Human leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control**. Geneva: World Health Organization 122p. Disponível em: <http://www.who.int/iris/handle/10665/42667> Acesso em: 08 jul. 2018.

Williams CMM (2008) Technologies to mitigate environmental impact of swine production. **Revista Brasileira de Zootecnia** 37: 253-259.

Zamora J, Riedemann S, Frías M (1988) Infección por *Leptospira interrogans* serogrupo Pomona serovar kennewicki en porcinos. **Archivos de Medicina Veterinária** 20(2): 134-135.

CAPÍTULO 4 - Isolamento, caracterização molecular e sorológica de *Leptospira santarosai* sorogrupo Sejroe de suíno do Estado de São Paulo

Resumo - A leptospirose é uma doença infecciosa sistêmica, que se destaca como importante antroponose. Por se tratar de uma doença que acomete uma ampla variedade de espécies, é importante conhecer a epidemiologia da enfermidade. O objetivo do estudo foi isolar e realizar a caracterização sorológica e molecular de *Leptospira* spp. em suínos no Estado de São Paulo. Para tanto, 69 amostras de sangue, sessenta amostras de urina e seis rins de suínos clinicamente sadios foram coletadas em um abatedouro localizado na Mesorregião de Ribeirão Preto, SP, provenientes de uma granja em Monte Azul Paulista - SP, em fevereiro de 2016. Para análise sorológica, utilizou-se o teste de soroaglutinação microscópica (MAT). As amostras de urina e tecido renal foram semeadas nos meios de cultura Fletcher e EMJH. Para confirmação e caracterização de culturas bacterianas, foram utilizadas as técnicas de sorogrupagem, PCR (gene *lipL32*), sequenciamento nucleotídico dos genes *rrs* e *secY*. Pelo MAT, 24,63% (17/69) das amostras foram sororreagentes contra os sorogrupos: Autumnalis, Icterohaemorrhagiae, Shermani e Sejroe. Uma cultura com multiplicação de *Leptospira* spp. foi obtida de amostra de urina de suíno e identificado como pertencente ao sorogrupo Sejroe, cujos títulos de anticorpos foram de 12.800, 6.400 e 1.600 contra os sorovares Hardjoprajitno, Hardjobovis e Wolffi, respectivamente. O isolado foi classificado como patogênico pela técnica de *lipL32*-PCR. A identificação da espécie revelou 99% de identidade com as sequências de *L. santarosai*. Em conclusão, o isolamento de *Leptospira santarosai* de suíno destinado ao abate destaca a importância destes hospedeiros na disseminação deste patógeno no ambiente e seu potencial como carreador dessa bactéria.

Introdução

A leptospirose é considerada uma antroponose reemergente, importante em todo o mundo (Bharti et al., 2003), com potencial epidêmico, principalmente onde há associação de fatores ambientais, sociais e sanitários. Em países tropicais, como

o Brasil, o risco é maior devido às altas temperaturas e à pluviosidade, com possibilidade de alagamento em algumas áreas, situações que facilitam a disseminação da doença (Vijayachari et al., 2008).

Todos os mamíferos são suscetíveis e capazes de manter a bactéria em seus organismos (Jobbins e Alexander, 2015), e em muitos momentos eliminá-la no meio, possibilitando a manutenção da cadeia epidemiológica da leptospirose. A eliminação do agente pode acontecer de forma intermitente ou contínua pela urina e perdurar por dias, anos e até por toda a vida do animal, sendo os animais que eliminam urina com o pH alcalino destaque na disseminação desta bactéria, pois as leptospirosas podem se manter viáveis por mais tempo nesta situação (Faine et al., 1999).

A transmissão ocorre pelo contato direto ou indireto com secreções, especialmente urina, de animal infectado (Levett, 2001), que pode contaminar a água e/ou o solo; para os humanos, o risco de infecção ocorre a partir de atividades ocupacionais e recreativas em ambientes no qual existe estreito contato com os animais. Muitas vezes fatores climáticos, como inundações, desencadeiam surtos de leptospirose (Yang, 2007).

A infecção pode se apresentar de forma assintomática ou com sintomas inespecíficos, podendo passar despercebida, tornando-se uma doença negligenciada (Haake e Levett, 2015), ou de forma grave, muitas vezes letal, em animais e seres humanos (Levett, 2001). Além do problema sanitário, é responsável por severas perdas econômicas na produção animal, pois causa abortos, natimortos, infertilidade, redução da produção de leite e óbito de animais (Faine et al., 1999).

Dentre as diferentes cadeias produtivas integrantes do sistema agroindustrial brasileiro, a de suínos vem se destacando devido à importância para a economia nacional, apresentando amplo potencial de geração de empregos, renda e divisas (Gomes, 2002). No entanto, problemas sanitários são entraves na suinocultura, sendo a leptospirose uma das principais causas de falhas reprodutivas na suinocultura brasileira, principalmente nas regiões sul e sudeste do país (Shimabukuro et al., 2003).

Os suínos podem ser hospedeiros de manutenção de leptospirosas, especialmente dos sorovares Pomona, Bratislava e Tarassovi, e hospedeiros acidentais de outros sorovares (Ellis, 1992), dentre eles algumas com alta

capacidade patógena. A *L. santarosai* (Ko et al., 2009), espécie já descrita por Yasuda e colaboradores (1987), muitas vezes é responsável por desencadear a forma grave da doença em humanos, a síndrome de Weil, que gera insuficiência renal aguda e alterações no fígado e nos pulmões, sendo uma das espécies mais patogênicas para os humanos (Covic et al., 2003).

Apesar da importância da leptospirose, existem muitas outras doenças com sintomas semelhantes, fatores que dificultam o diagnóstico, necessitando de uma avaliação mais detalhada, unindo análises laboratoriais e epidemiológicas, aliando métodos bacteriológicos, microscópicos, sorológicos e moleculares para elucidação da enfermidade e desenvolvimento de métodos de controle e prevenção efetivos (Jobbins e Alexander, 2015). Como base nesses fatores, a identificação de que um sorovar/sorogrupo está presente é essencial para melhor compreensão e prevenção da doença (Ellis, 2015).

Dado que o isolamento e a caracterização auxiliam na compreensão do papel da *Leptospira* spp. (Miotto et al., 2016), o objetivo do trabalho foi isolar e realizar caracterização sorológica e molecular de isolado de *Leptospira* spp. em suínos do Estado de São Paulo.

Material e Métodos

Amostras

Para este estudo foram colhidas 69 amostras de sangue, sessenta amostras de urina e seis rins em matadouro-frigorífico da Macrorregião de Ribeirão Preto, de animais oriundos de uma granja do município de Monte Azul Paulista - SP, em fevereiro de 2016. A escolha dos animais foi feita sem distinção de sexo, raça, idade ou procedência. Nos animais nos quais a bexiga permaneceu íntegra ao final do abate, foi coletada urina, assim como os rins que não haviam sido cortados, contaminados com fluidos estomacais ou haviam perdido a membrana verdadeira, sem preferência quanto à posição do órgão, direita ou esquerda.

O número do documento oficial para transporte de animal no Brasil, Guia de Trânsito Animal (GTA), foi anotado, assim como demais dados relevantes descritos

nele, para posteriormente ser possível o contato com o proprietário para realização de um questionário epidemiológico.

O trabalho foi aprovado, sob nº 12276/15, pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Câmpus de Jaboticabal/Unesp – SP, Brasil, respeitando os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Colheita do material

As amostras de sangue foram coletadas no momento da sangria na linha de abate, em tubos descartáveis de coleta de sangue sem anticoagulante ou aditivo. Imediatamente após a coleta, o sangue foi mantido em temperatura ambiente até a retração do coágulo. Posteriormente o soro foi transferido para microtubos e estocado a -20°C até o momento do exame.

As amostras de urina foram coletadas por cistocentese na linha de abate, na quantidade de 5 a 10 mL/animal, com auxílio de seringas esterilizadas. Os rins foram colhidos durante a fase de evisceração, armazenados individualmente em sacos de polipropileno esterilizados, devidamente vedados e identificados.

No primeiro momento, a urina foi armazenada em temperatura ambiente, e os rins armazenados em caixa isotérmica contendo gelo, para manutenção da temperatura entre 2°C e 8°C, para, em condições assépticas, serem semeados.

Isolamento

Aproximadamente 3 cm³ da região do parênquima renal foram extraídos. A manipulação dos órgãos ocorreu de forma asséptica, dentro de câmara de fluxo laminar, utilizando instrumentos esterilizados. Cada fragmento foi colocado dentro de coletor universal esterilizado, onde foi triturado cuidadosamente, e adicionados 10 mL de solução de NaCl 0,9%. Posteriormente o conteúdo foi homogeneizado levemente e o material deixado por uma hora em repouso, para separar o sobrenadante do precipitado.

O sobrenadante, assim como a urina, foi semeado em meios de cultura, com o auxílio de seringas descartáveis esterilizadas acopladas a filtros de 0,22 µm (filtro de

seringa KASVI, k18-230, PES membrane, Max. Pressure: 4,5 bars), manuseado em condições assépticas.

Por amostra, foram utilizados dois tubos de meios de cultura: um contendo 10 mL de meio de cultura semissólido, Fletcher, e outro com 10 mL de meio líquido, EMJH (Thiermann, 1984; Ellis et al., 1982), inicialmente com antibiótico 5-fluorouracil e ácido nalidíxico, para auxiliar a descontaminação do material (Miraglia et al., 2009). Por tubo, foram inoculadas cinco gotas de filtrado e após 24 horas foi realizado um repique do meio com antibiótico para um meio sem antibiótico. Os tubos foram incubados em estufa do tipo B.O.D a $29^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e examinadas visualmente e em microscopia de campo escuro semanalmente, por até 24 semanas.

Nas amostras em que foram observados anéis de opalescência ou nuvens de multiplicação, os tubos foram separados, e sua pureza avaliada; nos casos em que a cultura estava contaminada, esta foi repicada em um tubo contendo o mesmo tipo de meio da amostra suspeita (Fletcher ou EMJH), inicialmente com antibiótico 5-fluorouracil e ácido nalidíxico (Miraglia et al., 2009), e após 24 horas a mesma amostra foi repicada em meio sem antibiótico (Thiermann, 1984; Ellis et al., 1982); o processo foi repetido semanalmente até se obter um isolado sem contaminantes.

Dos meios com suspeita de multiplicação de *Leptospira* spp. foi retirada uma alíquota para observação em microscopia de campo escuro com objetiva de 10x e caracterização molecular.

Sorogrupagem

Para estimar o sorogrupo ao qual pertencia a amostra bacteriana de *Leptospira* isolada foi utilizada a técnica de sorogrupagem (Faine et al., 1999), com 32 antissoros (Andamana, Bratislava, Australis, Autumnalis, Castellonis, Bataviae, Canicola, Celledoni, Codice, Cynopteri, Djasiman, Grippytyphosa, Hebdomadis, Holland, Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Lousiana, Lyme, Manhao, Mini, Panama, Pomona, Pyrogenes, Pinchang, Sarmin, Hardjoprajitno, Hardjobovis, Wolffi, Patoc, Shermani e Tarassovi), correspondentes a 28 sorogrupos (Andamana, Australis, Autumnalis, Ballum, Bataviae, Canicola, Celledoni, Codice, Cynopteri, Djasiman, Grippytyphosa, Hebdomadis, Holland, Icterohaemorrhagiae, Javanica,

Lousiana, Lyme, Manhao, Mini, Panama, Pomona, Pyrogenes, Ranarum, Sarmin, Sejroe, Semarang, Shermani e Tarassovi), fornecidos pelo Royal Tropical Institute (KIT, Amsterdã).

Extração de DNA e reação em cadeia da polimerase

Quando a cultura obteve multiplicação bacteriana entre 10^7 e 10^8 células por mL, foi realizada a extração de DNA com o Kit Wizard SV Genomic DNA Purification System® (Promega), conforme instruções do fabricante. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional teve como gene-alvo o lipL32, presente apenas nas leptospiros consideradas patogênicas, utilizando os primers LipL32-45F (5'-AAG CAT TAC CGC TTG TGG TG-3') e LipL32-286R (5'-GAA CTC CCA TTT CAG CGA TT-3'), que geram um fragmento de 242 pb (Stoddard et al., 2009). A reação foi realizada com volume final de 25 µL, 10x de buffer, 2,5 mM de MgCl₂, 0,6 picomol de cada primer, 25 mM de dNTPs, 1 U de GoTaq® DNA Polymerase (Promega) e 30 ng de DNA. O programa de temperaturas incluiu: uma desnaturação inicial de 94°C durante dois minutos, seguida de quarenta ciclos de desnaturação a 94° por trinta segundos, emparelhamento dos iniciadores a 53°C por trinta segundos, extensão a 72°C por um minuto, e extensão final de 72°C durante cinco minutos.

A determinação da espécie de *Leptospira* foi realizada por meio de PCR e sequenciamento nucleotídico dos genes *rrs* (16S rRNA) e *secY*. Os primers utilizados para a amplificação do 16S foram 16S fD1 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' e 16S rP2 5'-ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT-3' (Weisburg et al., 1991). A reação foi realizada com volume final de 25 µL, buffer 10x, 2,0 mM de MgCl₂, 0,6 picomol de cada primer, 25 mM de dNTPs, 0,5 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e 30 ng de DNA. O programa de temperaturas incluiu uma desnaturação inicial de 95°C por cinco minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por dois minutos, pareamento dos iniciadores a 42°C por trinta segundos, extensão a 72°C por três minutos, e extensão final de 72°C durante dez minutos. Os primers utilizados para a amplificação do *secY* foram *secYF* 5'-ATG CCG ATC ATT TTT GCT TC-3' e *secYR* 5'-CCG TCC CTT AAT TTT AGA CTT CTT C-3' (Ahmed et al., 2006), reação realizada com volume final de 25 µL, buffer 10x, 1,5 mM de MgCl₂, 0,6 picomol de cada primer, 25 mM de dNTPs, 0,5 U de Taq DNA Polimerase

(Invitrogen) e 30 ng de DNA. O programa de temperaturas incluiu: uma desnaturação inicial de 95°C por cinco minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por trinta segundos, 58°C por trinta segundos, 72°C por um minuto, e extensão final de 72°C por sete minutos.

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

Sequenciamento nucleotídico

Os produtos de PCR foram purificados com GFX PCR DNA Gel Band Purification kit (GE HealthCare). A reação de sequenciamento nucleotídico foi realizada utilizando o BigDye Terminator v3.1 kit (Applied Biosystems). O sequenciamento nucleotídico do gene *rrs* incluiu a utilização de primers internos, Lepto16SF1 5'-GGC GGY GCT CTT WAW CAT-3' e Lepto16SR2 5'-ATC CCG TTC ACT ACC CAC GC-3' (Fenner et al., 2010), além dos anteriormente descritos. A eletroforese capilar foi realizada em sequenciador automático ABI 3730 (Applied Biosystems). As sequências foram editadas utilizando os programas BioEdit v.7.0.4. (Hall, 1999) e MEGA v.6. (Tamura et al., 2011).

Variable-Number Tandem-Repeat (VNTR)

A técnica do VNTR foi realizada na tentativa de genotipar as estirpes de *Leptospira*. O protocolo para *L. santarosai* envolveu três alvos genéticos: VNTR S1 (primers F 5'- CGA GTG AAC CTT GCT TGA CA-3' e R 5'- CGG TCA TAG GCA TAG TGG GA-3'); VNTR S2 (primers F 5'- AAG ACC CTA CAA GCC GCT TC-3' e R 5'- TCC ATA CCC GGT CCT TTA CT-3'); e VNTR S10 (primers F5'- GCG GAA AAG TCG TGA ATG GA-3' e R 5'- AAC TCA CAA CCC TCC CGA AA-3'), conforme Hamond et al. (2015). A reação foi realizada com volume final de 25 µL, buffer 10x, 4,0 mM de MgCl₂, 0,6 picomol de cada primer, 25 mM de dNTPs, 0,5 U de Taq polymerase (Amersham) e 30 ng de DNA. O programa de temperaturas incluiu: uma desnaturação inicial de 94°C por cinco minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por

trinta segundos, 55°C por trinta segundos, 72°C por um minuto e trinta segundos, e extensão final de 72°C por dez minutos. Uma alteração no protocolo foi realizada: temperatura de anelamento de 60°C para o alvo genético VNTR S2. A eletroforese em gel de agarose 1,5%, utilizando o corante GelRed (Invitrogen), foi realizada, e os resultados foram visualizados sob luz ultravioleta.

Técnica de soroaglutinação microscópica (MAT)

Para a pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira* spp., foi utilizada a técnica de soroaglutinação microscópica (MAT) (OIE, 2014), empregando uma coleção de antígenos contendo 34 sorovares (24 de referência: Andamana, Australis, Bratislava, Autumnalis, Butembo, Castellonis, Bataviae, Canicola, Whitcombi, Cynopteri, Sentot, Grippotyphosa, Hebdomadis, Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Panama, Pomona, Pyrogenes, Hardjo, Wolffi, Patoc, Shermani, Tarassovi; 10 estirpes autóctones isoladas de animais no Brasil: Guaricura, Goiano, LO10, LO04, GR6, 2A-CAP, Brasiliensis, 110/06, LO14 (tabela 01); e posteriormente ao isolamento, o isolado descrito neste trabalho, Unesp03, tabela 01).

Tabela 1. Estirpes de leptospiros autóctones isoladas no Brasil, segundo sorovar, sorogrupo, espécie e animal de origem.

Estirpe	Sorovar	Sorogrupo	Especie	Animal
Guaicurus	Guaricura	Sejroe	<i>L. santarosai</i>	Búfalo
Goiano	Goiano	Hebdomadis	<i>L. interrogans</i>	Bovino
LO10	Copenhageni	Icterohaemorrhagiae	<i>L. interrogans</i>	Bovino
LO4	Canicola	Canicola	<i>L. interrogans</i>	Suíno
GR6	Pomona	Pomona	<i>L. interrogans</i>	Suíno
2A – CAP	Bananal	Grippotyphosa	<i>L. santarosai</i>	Capivara
BRA	Brasiliensis	Bataviae	<i>L. santarosai</i>	Gambá
110/06	-	Pomona	<i>L. kirschneri</i>	Cachorro do Mato
LO14	Canicola	Canicola	<i>L. interrogans</i>	Canino
Unesp03	Hardjoprajitno, Hardjobovis, Wolffi	Sejroe	<i>L. santarosai</i>	Suíno

Resultados

Sorologia

Das 69 amostras de soro, 17 (24,6%) foram reagentes contra os sorovares Autumnalis, Icterohaemorrhagiae, Lo10, Shermani, Unesp03, dos sorogrupos Autumnalis, Icterohaemorrhagiae, Shermani e Sejroe (Tabela 2).

Tabela 2. Sorogrupo, Sorovar e número (N°) de reações para cada título de aglutininas de dezessete suínos sororreagentes pelo teste de soroaglutinação microscópica, a uma ou mais das 34 sorovariedades de *Leptospira* spp., entre 69 suínos, abatidos no mês de fevereiro, na Mesorregião de Ribeirão Preto, 2016.

Sorogrupo	Sorovar	Título		Total
		100 N°	200 N°	
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	10	3	13
	Lo10	1	0	1
Autumnalis	Autumnalis	1	0	1
Shermani	Shermani	1	0	1
Sejroe	Unesp03	1	0	1

Isolamento

Uma cultura bacteriana foi obtida da urina de suíno, após três meses de incubação, denominada Unesp03. O isolado foi sorogrupoado como pertencente ao sorogrupo Sejroe, apresentando os títulos 12.800, 6.400 e 1.600 contra os sorovares de Hardjoprajitno, Hardjobovis e Wolffi, respectivamente. Ao atingir a multiplicação necessária para extração de DNA, o material genético obtido foi utilizado para realizar as análises da amostra; na reação de PCR convencional para detecção de leptospiros patogênicos, utilizando como alvo genético o gene *lipL32*, a amostra foi positiva.

A determinação da espécie de *Leptospira* por meio de sequenciamento nucleotídico do gene *rrs* apresentou 99% de identidade com sequência de referência da *L. santarosai*, e 15 polimorfismos em relação às outras sequências, caracterizando a espécie *L. santarosai* (Tabela 3). O isolado foi depositado no GenBank sob o número de acesso: MH686123.

Dados do questionário

Após o isolamento e com as informações contidas na GTA foi contactado o responsável pela granja e aplicado um questionário epidemiológico, obtendo-se dados importantes para a compreensão dos resultados dos exames de leptospirose. Dentre eles, que a propriedade tem como renda, além da suinocultura, a produção de cana de açúcar, citros e gado de leite. Com relação à localização, foi passada a latitude e longitude, não descritas aqui, devido ao compromisso de confidencialidade, no entanto utilizadas para visualizar no earthexplorer - USGS, para avaliação mais detalhada da área com imagens de satélite de monitoramento vegetal (eMODIS NDVI V6), onde foi observado que a granja faz fronteira com a reserva ambiental da propriedade, área com presença de um dos cursos d'água do Rio Turvo.

No preenchimento do questionário, o responsável pela granja revelou que a criação é em sistema intensivo, sem área de quarentena ou enfermaria, nem faz vazio sanitário após a retirada dos animais. Que não há sistema anti-animais sinantrópicos na área de armazenamento de ração, nem cercas ao redor das granjas para evitar entrada de outros animais.

Em relação aos principais problemas sanitários dos animais da propriedade, relatou diarreia e problemas intestinais na fase inicial e problemas respiratórios na vida adulta. E em relação ao conhecimento sobre zoonoses, o responsável pela propriedade desconhecia que urina e sangue de animais transmitam doenças, a não ser a dos ratos. A propriedade tem presença de cães tanto para companhia como para proteção da propriedade, sob os cuidados dos funcionários.

Discussão

Sorologia

O MAT é o teste sorológico de referência, padrão-ouro, para diagnóstico de leptospirose, e mesmo após o desenvolvimento de métodos moleculares é muito utilizado, por ser confiável e com rápida obtenção de resultado (WHO, 2003), suprimindo a falta de sensibilidade do método de isolamento (Romero et al., 2009). É

uma técnica indireta, específica para detecção de anticorpos anti-*Leptospira* (Haake, Levett, 2015), mas que é passível de resultados errôneos quando é avaliado se atentando apenas aos sorovares, pois podem ocorrer reações cruzadas entre sorovares do mesmo sorogrupo, muito frequentes na fase aguda da doença, pela presença de lipopolissacarídeos comuns a vários sorovares, ou mesmo a presença de anticorpos inespecíficos, sendo mais confiável a apresentação dos resultados por sorogrupo (Faine et al., 1999).

No presente trabalho, os resultados foram descritos como sorovar / sorogrupo (Tabela 1), para demonstrar a quais sorovares as amostras reagiram frente à coleção de antígenos utilizada e ao sorogrupo ao qual pertence, para minimizar as interferências de falsas reações; o sorogrupo presuntivo é útil para a compreensão epidemiológica da doença (Levett, 2001). Não foi necessário determinar o sorovar / sorogrupo mais provável de cada amostra, pois cada soro reagiu a apenas um antígeno.

Apesar de o MAT não ser capaz de diferenciar entre fases da infecção (Limmathurotsakul et al., 2012), é utilizado em estudos, e essencial para desenvolvimento de estratégias de prevenção e controle (Chirathaworn et al., 2014). Na sorologia, 24,6% das amostras foram positivas, contra os sorogrupos Autumnalis, Icterohaemorrhagiae, Shermani e Sejroe, os dois primeiros já foram descritos como acidentais para os suínos (Ellis, 1992). A diversidade de sorogrupos reagentes pode ser explicada pela possibilidade de animais em áreas endêmicas serem infectados por mais de um sorovar e sorogrupo no decorrer do tempo, e infecções recorrentes ativarem a memória imunológica (Chirathaworn et al., 2014). No presente trabalho o sorogrupo Icterohaemorrhagiae se destacou com maior número de sororreagentes.

Em relação à sororreatividade, outros pesquisadores obtiveram resultados inferiores aos do presente trabalho, observando 8,60% de suínos soropositivos, utilizando uma coleção de 18 antígenos (Larsson et al., 1984); o uso de menor número de sorovares como antígenos pode ter influenciado o resultado, pois com o aumento do número de antígenos se eleva a sensibilidade do teste. Destaque-se que uma coleção de antígenos ideal deve basear-se no conhecimento dos sorovares circulantes na região, de preferência utilizando isolados autóctones; na impossibilidade, deve-se utilizar uma coleção ampla, com o maior número de

sorogrupos patogênicos possível (Sarmiento et al., 2012). Poucos trabalhos descrevem os antígenos utilizados na técnica sorológica para leptospirose em suínos, e podem ser utilizados para comparação, por ter os mesmos critérios do presente trabalho, como o estado dos animais abatidos.

Isolamento

Além da sorologia, foram realizados isolamento e caracterização de uma amostra da espécie *L. santarosai*, sorogrupo Sejroe. Embora a técnica seja laboriosa, de custo elevado e demorada, muitas vezes superior a seis meses (Ellis, 1992), é um teste de alta especificidade e seu resultado é irrefutável, com relevante papel no estudo de epidemias e epidemiologia (Hsieh e Pan, 2004), fornecendo informações cruciais, auxiliando na compreensão de padrões de apresentação da doença (WHO, 2003).

No sequenciamento nucleotídico do gene *rrs* o isolado apresentou 99% de identidade com a sequência de *L. santarosai* descrita por Chou e colaboradores (2012), espécie confirmada pelo sequenciamento do gene *secY*, apresentando 99% de identidade com a sequência de *L. santarosai*, descrita por Victoria e colaboradores (2008).

A *Leptospira santarosai* já foi encontrada na América Latina (Nalam et al., 2010), sendo isolada no Brasil em bufalo (Vasconcellos et al., 2001), e recentemente na Colômbia em humanos, cães, macaco-prego e roedores (Sanchez, 2016), demonstrando ser uma preocupação para a saúde pública, pois já foi isolada de humanos e animais, ressaltando seu potencial zoonótico (Bourhy et al., 2013; Chou et al., 2014). Esta espécie é muito relatada em países asiáticos (Yang, 2007), dando origem a casos que se apresentam com manifestações clínicas, variando de infecção subclínica com sinal febril, dor de cabeça e dores musculares, a formas graves, com presença de icterícia, insuficiência renal e pulmonar, forma essa conhecida como síndrome de Weil, que pode ser fatal (Ko et al., 2009).

Esta espécie de *Leptospira* é conhecida como a mais patogênica, com capacidade invasiva nos pulmão e rins, no entanto o isolamento de amostra de tecido pulmonar é difícil, sendo mais indicado o isolamento de tecido renal, devido à quantidade de leptospiros presentes nesse órgão (Inada et al., 1916). Outras formas

de confirmar a presença deste patógeno são possíveis. Alves e colaboradores (1989) obtiveram resultados positivos para *Leptospira* pelo teste de imuno-histoquímica em lesões pulmonares, o que sugere a participação dessa bactéria em alterações nesse órgão. Na granja de origem dos animais, o proprietário relatou que as síndromes respiratórias, de causas variadas, são o principal problema na terminação; tendo em vista a capacidade da *L. santarosai* de lesionar o tecido pulmonar, a síndrome respiratória presente na granja pode ter participação ou ser agravada pela presença de leptospiros. As lesões pulmonares causadas podem ser por ação direta da *Leptospira*, com a produção de endotoxinas, que levam a vasculite e podem acarretar hemorragias pulmonares, ou indireta, pela produção de citocinas pela resposta imunológica à presença do patógeno (Marchiori et al., 2011).

Já foram relatados comprometimentos respiratórios causados pela *L. santarosai* em animais (Pereira et al., 2005) e em humanos (Valverde et al., 2008), tanto no Brasil (Ko et al., 1999) quanto em países vizinhos (Seijo et al., 2002).

A genotipagem pela técnica VNTR para a espécie *L. santarosai* determinou o genótipo da amostra Unesp03 (VNTR S1 = 3; VNTR S2 = 15; e VNTR S9 = 18), genótipo descrito por Jaeger e colaboradores (2018), de um isolado obtido de amostra de bovino da raça zebu por Santa Rosa e colaboradores (1980), identificado como uma estirpe guaicurus, cepa de referência Bov. G, do sorogrupo Sejroe. Embora a técnica VNTR não permita a identificação do sorovar da leptospira, tem sua importância como ferramenta para diferenciação de estirpes e auxilia na compreensão da epidemiologia da leptospirose (Jaeger et al., 2018).

Após o isolamento e tipificação, várias lacunas no conhecimento sobre a epidemiologia desta espécie podem ser compreendidas, como a presença da bactéria no Estado de São Paulo e a participação do suíno na disseminação da doença. No entanto, é difícil elucidar como ocorreu a infecção do suíno na granja, dado que o sorogrupo Sejroe é comumente associado a infecções em ruminantes (Deveson Lucas et al., 2014), por ser um sorogrupo considerado adaptado a essas espécies (Ayanegui-Alcerreca et al., 2007), fato confirmado com o isolamento em bovinos e búfalos (Vasconcellos et al., 2001). Em estudos sorológicos, o sorogrupo Sejroe se apresenta como o mais prevalente em bovinos em todo o mundo (Ellis, 2015). Devido à presença de bovinos na propriedade e à ausência de cercas ou

proteção ao redor das granjas, é possível que os suínos tenham tido contato, de forma direta ou indireta, com esses animais ou até mesmo com animais selvagens ou sinantrópicos infectados com esse sorogrupo de leptospira.

Não se pode afirmar a fonte da infecção; apesar da presença de ruminantes na propriedade, há a possibilidade de contato com animais selvagens, devido à proximidade com a área de reserva. Devido à diversidade e abundância da fauna no Brasil, pouco se conhece sobre o papel das espécies selvagens na epidemiologia de leptospirose (Faine et al., 1999). Determinar as fontes e rotas de transmissão é um desafio em ambientes em que coexistem múltiplos animais com potencial de serem hospedeiros (Allan et al., 2015).

O isolamento de uma leptospira de uma amostra coletada no fim do mês de fevereiro de 2016, período que teve 14 dias de chuva, totalizando 190,2 mm, com uma média de chuva nos seis meses anteriores, período de criação dos suínos, de 122,8 mm/mês, e com 69 dias de chuva (CIIAGRO, 2018), destaca que existe possibilidade de essa bactéria ter sido eliminada durante o período de criação e terminação dos animais, e pela ausência de tratamento dos dejetos na propriedade, esse ter ido para o ambiente e alcançado diferentes áreas com o auxílio da chuva. Em estudo realizado em municípios do Estado de São Paulo, o mês de fevereiro foi considerado o segundo a apresentar os maiores índices pluviométricos, no Brasil, com áreas de alagamento, numa média histórica de 34 anos (Cruciani et al., 2002).

As condições climáticas influenciam fortemente a transmissão de leptospiros patogênicas, que requerem condições quentes e úmidas para sobrevivência. O período de chuvas está associado a maior número de casos de leptospirose em todo o mundo (Bharti et al., 2003), particularmente prevalente em países em desenvolvimento, onde há associação de condições climáticas, ambientais e falta de saneamento, fatores favoráveis à sobrevivência e transmissão desse patógeno (Levett, 2001).

Com os dados obtidos no isolamento e na sorologia pode-se afirmar que essa bactéria está circulante no meio, possibilitando a infecção de outros animais e de tratadores, e se os dejetos não forem manejados da maneira correta podem contaminar o solo da área de reserva, possibilitando a infecção de outros animais, ocorrendo a manutenção do ciclo epidemiológico da *Leptospira*, ou até mesmo

contaminar o curso d'água do Rio Turvo, que passa no interior da propriedade e banha 22 municípios do Estado de São Paulo, desaguardo na bacia do Rio Grande (IGC, 2018) .

Além dos riscos provenientes do manejo incorreto, o isolamento ocorreu em um período de alta pluviosidade, ambiente favorável para disseminação da infecção. Mesmo que a amostra tenha sido coletada de animal abatido, esse animal permaneceu durante todo o período de engorda na granja, e passou o período das chuvas na unidade. Apesar de as leptospiros não se multiplicarem fora do hospedeiro, a água, em condições ideais, propicia ambiente favorável para que as leptospiros se mantenham por um longo período no ambiente (Enrietti, 2001).

Devido à diversidade de sorovares e de hospedeiros da *Leptospira*, a prevenção e o controle da leptospirose constituem um desafio, especialmente para os países de ambiente tropical, sendo necessária a identificação dos animais envolvidos no ciclo epidemiológico da doença e quais leptospiros estão presentes, para poder compreender melhor a doença e agir de forma eficiente.

Com o isolamento de *Leptospira*, da urina de suíno, de um sorogrupo aparentemente não isolado anteriormente dessa espécie, comprova-se que este era portador renal do patógeno. Apesar de não ser considerado uma espécie adaptada, o animal não demonstrava sinais clínicos no momento do abate, e pela avaliação clínica apresentava-se saudável, apto ao abate, embora estivesse albergando o patógeno, com potencial de disseminá-lo. Devido ao modo de criação dos suínos, e à necessidade de higienização das baias diariamente, área com lâmina de d'água constante, e um contato constante com tratadores, o suíno se destaca como um possível transmissor da doença para trabalhadores da cadeia produtiva do suíno. Fato de grande preocupação, dada a espécie de leptospira encontrada ser considerada muito patogênica e responsável pela forma mais grave da doença, a síndrome de Weil, que causa uma série de disfunções no organismo humano e pode ser fatal se não for tratada (Yang, 2007).

O controle e a prevenção da leptospirose são muitas vezes limitados devido à falta de conhecimento sobre o agente etiológico, os hospedeiros e como se dá a transmissão da doença em contexto regional (Naotunna et al., 2016). O controle baseia-se na interrupção direta e indireta da cadeia epidemiológica (Ellis, 2015),

passível de ser realizada apenas quando se identifica o hospedeiro (Naotunna et al., 2016).

Conclusão

Em conclusão, o fato de se ter obtido o isolamento de *Leptospira santarosai* de suíno destinado ao abate confirma a importância destes hospedeiros na manutenção da *Leptospira* spp. no ecossistema e seu potencial como fonte de infecção dessa espécie de bactéria. A presença de uma espécie tão relevante como agente de zoonose deve ser vista como um alerta aos sistemas de vigilância e uma preocupação para a saúde animal e humana, ressaltada a importância de ver a doença dentro do contexto de saúde única.

A utilização de técnicas moleculares, genéticas e imunológicas, complementares, enriquece o grau de informações obtidas no trabalho e auxilia na compreensão da leptospirose nessa espécie animal e na região em que ocorreu o isolamento.

Referências

Ahmed N, Devi SM, Valverde Mde L, Vijayachari P, Machang'u RS, Ellis WA, Hartskeerl RA (2006) Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials** 5: 28 1-10.

Allan KJ, Halliday JEB, Cleaveland S (2015) Renewing the momentum for leptospirosis research in Africa. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 109: 605-606.

Alves V, Siqueira S, Pestana C (1989) Patologia da leptospirose. Análise crítica dos aspectos morfológicos e imuno-histoquímicos relevantes para a compreensão da patogenia. **Revista do Instituto Adolfo Lutz** 49: 75-80.

Ayanegui-Alcerreca MA, Wilson PR, Mackintosh CG, Collins-Emerson JM, Heuer C, Midwinter AC, Castillo-Alcala F (2007) Leptospirosis in farmed deer in New Zealand: A review. **The New Zealand Veterinary Journal** 55: 102-108.

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.

Bourhy, P, Herrmann-Storck C, Theodose R, Olive C, Nicolas M, Hochedez P, Lamaury I, Zinini F, Brémont S, Landier A (2013) Serovar diversity of pathogenic *Leptospira* circulating in the French West Indies. **PLOS Neglected Tropical Diseases** 7: e2114.

Chirathaworn C, Inwattana R, Poovorawan Y, Duangjai S, 2014. Interpretation of microscopic agglutination test for leptospirosis diagnosis and seroprevalence. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine** 4: S162–S164.

Chou LF, Chen TW, Ko YC, Pan MJ, Tian YC, Chiu CH, Tang P, Hung CC, Yang CW (2014) Potential impact on kidney infection: A whole-genome analysis of *Leptospira santarosai* serovar Shermani. **Emerging Microbes & Infections** 3: e82 1-11.

Chou LF, Chen YT, Lu CW, Ko YC, Tang CY, Pan MJ, Tian YC, Chiu CH, Hung CC, Yang CW (2012) Sequence of *Leptospira santarosai* serovar Shermani genome and prediction of virulence-associated genes. **Gene** 511: 364–370.

CIIAGRO - Centro integrado de informações agrometeorológicas (2018) **Quadro de chuvas.** Disponível em: <http://www.ciiagro.sp.gov.br/ciiagroonline/quadros/qchuvaperiodo.asp>. Acesso em: 10 abr. 2018.

Covic A, Goldsmith D, Gusbeth-Tatomir P, Seica A, Covic M (2003) A retrospective 5-year study in Moldova of acute renal failure due to leptospirosis: 58 cases and a review of the literature. **Nephrology Dialysis Transplant** 18: 1128-1134

Cruciani DE, Machado RE, Sentelhas PC (2002) Modelos da distribuição temporal de chuvas intensas em Piracicaba, SP. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. 6: 176-82.

Deveson Lucas DS, Lo M, Bulach DM, Quinsey NS, Murray GL, Allen A, Adler B (2014) Recombinant LipL32 stimulates interferon-gamma production in cattle vaccinated with a monovalent *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo subtype Hardjobovis vaccine. **Veterinary Microbiology** 169: 163-170.

Ellis, WA (2015) Animal leptospirosis. In: Adler B. ***Leptospira and Leptospirosis***. Springer, New York 14(2): 99-137.

Ellis WA (1992) *Leptospirosis in pigs*. **Pig Veterinary Journal** 28: 24–34.

Ellis WA, Neill SD, Brien JJO, Cassells JA, Hanna J (1982) Bovine leptospirosis: Microbiological and serological findings in normal fetuses removed from the uteri after slaughter. **Veterinary Record** 110: 192–194.

Enrietti MA (2001) Contribuição ao conhecimento da incidência de leptospirosas em murédeos, caninos e suínos no Paraná. **Brazilian Archives of Biology And Technology** Jubilee: 311 - 342

Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P (1999) ***Leptospira and Leptospirosis***. 2nd Edition, Medisci Press, Melbourne: Australia, 295 p.

Fenner JS, Anjum MF, Randall LP, Pritchard GC, Wu G, Errington J, Dalley CG, Woodward MJ (2010) Analysis of 16S rDNA sequences from pathogenic *Leptospira* serovars and use of single nucleotide polymorphisms for rapid speciation by D-HPLC. **Research in Veterinary Science** 89(1): 48-57.

Gomes MFM (2002) As cadeias agroindustriais da carne. **BDMG - Minas Gerais do século XXI** 4: 129-183.

Haake DA, Levett PN (2015) Leptospirosis in humans. In: Adler B. (Ed.), ***Leptospira and Leptospirosis***. Springer, New York, 14(2): 65-97.

Hall TA (1999) BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series** 41: 95-98.

Hamond C, Pinna M, Medeiros MA, Bourhy P, Lilenbaum W, Picardeau M (2015) A multilocus variable number tandem repeat analysis assay provides high discrimination for genotyping *Leptospira santarosai* strains. **Journal of Medical Microbiology** 64(5): 507-12.

Hsieh WJ, Pan MJ (2004) Identification *Leptospira santarosai* serovar shermani specific sequences by suppression subtractive hybridization. **FEMS Microbiology Letters** 235(1): 117-24.

Inada R, Ido Y, Hoke R, Kaneko R, Ito H (1916) The etiology, mode of infection and specific therapy of Weil's disease. **The Journal of Experimental Medicine** 23(3): 377-402

Instituto Geográfico e Cartográfico do Estado de São Paulo - ICG (2018) **Rede Hidrográfica**. Disponível em: <http://www.igc.sp.gov.br/>. Acesso em: 24 jul. 2018.

Jaeger LH, Loureiro AP, Lilenbaum W (2018) VNTR analysis demonstrates new patterns and high genetic diversity of *Leptospira* sp. of animal origin in Brazil. **Letters in Applied Microbiology** 67(2): 183-189

Jobbins SE, Alexander KA (2015) Evidence of *Leptospira* sp. infection among a diversity of African wildlife species: beyond the usual suspects. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 109 (5): 1–3.

Ko AI, Goarant C, Picardeau M (2009) *Leptospira*: The dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature Reviews Microbiology** 7: 736-747.

Ko AI, Reis MG, Dourado CMR, Johnson WD, Riley LW (1999) Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. **Lancet** 354(9181): 820-825.

Larsson CE, Yasuda PH, Santa Rosa CA, Costa EO (1984) Leptospirose suína. Inquérito sorológico e bacteriológico em municípios dos Estados de São Paulo, do Paraná e de Santa Catarina. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo** 21(1): 43-50.

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

Limmathurotsakul D, Turner EL, Wuthiekanun V, Thaipadungpanit J, Suputtamongkol Y, Chierakul W, Smythe LD, Day NP, Cooper B, Peacock SJ (2012) Fool's gold: Why imperfect reference tests are undermining the evaluation of novel diagnostics: A reevaluation of 5 diagnostic tests for leptospirosis. **Clinical Infectious Diseases** 55(3): 322-331.

Marchiori E, Lourenco S, Setúbal S, Zanetti G, Gasparetto T, Hochhegger B (2011) Clinical and imaging manifestations of hemorrhagic pulmonary leptospirosis: A state-of-the-art review. **Lung** 189: 1-9

Miotto BA, Moreno LZ, Guilloux AGA, Sousa GO, Loureiro AP, Moreno AM, Lilienbaum W, Vasconcellos SA, Heinemann MB, Hagiwaraaa MK (2016) Molecular and serological characterization of the first *Leptospira santarosai* strain isolated from a dog. **Acta Tropica** 162: 1–4.

Miraglia F, Moraes ZM, Melville PA, Dias RA, Vasconcellos SA (2009) EMJH medium with 5-fluorouracil and nalidixic acid associated with serial dilution technique used to recover *Leptospira* spp from experimentally contaminated bovine semen. **Brazilian Journal of Microbiology** 40: 189-193.

Nalam K, Ahmed A, Devi SM, Francalacci P, Baig M, Sechi LA, Hartskeerl RA, Ahmed, N (2010) Genetic affinities within a large global collection of pathogenic *Leptospira*: Implications for strain identification and molecular epidemiology. **PLoS One** 5: e12637.

Naotunna C, Agampodi SB, Agampodi TC (2016) Etiological agents causing leptospirosis in Sri Lanka: A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease** 9(4): 390–394.

OIE - World Organisation for Animal Health (2014) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. **Leptospirosis**. Paris, 1404 p. Disponível em: <http://www.oie.int/manual-of-diagnostic-tests-and-vaccines-for-terrestrial-animals/> Acesso em: 10 de jan. 2018.

Pereira MM, Da Silva JJ, Pinto MA, Da Silva MF, Machado MP, Lenzi HL, Marchevsky RS (2005) Experimental leptospirosis in marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*): A new model for studies of severe pulmonary leptospirosis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 72: 13-20.

Romero EC, Blanco RM, Galloway RL (2009) Application of pulsed-field gel electrophoresis for the discrimination of leptospiral isolates in Brazil. **Letters in Applied Microbiology** 48: 623–627.

Santa Rosa CA, Sulzer CR, Castro AF, Yanaguita RM, Giorgi W (1980) Two new leptospiral serovars in the Hebdomadis group isolated from cattle in Brazil. **The International Journal of Zoonoses** 7(2): 158–163

Sarmiento AMC, Azevedo SS, Moraes ZM, Souza GO, Oliveira FCS, Gonçalves AP, Miraglia F, Vasconcellos 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** 32: 601-606.

Seijo A, Coto H, San Juan J, Videla J, Deodato B, Cernigo B, Messina OG, Collia O, Bassadoni D, Schtirbu R, Olenchuk A, Mazzonelli GD, Parma A (2002) Distrés respiratorio debido a hemorragia pulmonar por leptospirosis. **Medicina** (Buenos Aires) 62: 135-40.

Shimabukuro FH, Domingues PF, Langoni H, Silva AV, Pinheiro JP, Padovani CR (2003) 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** 40: 243-253.

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.

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.

Thiermann AB (1984) Isolation of leptospirae in diagnosis of leptospirosis. **Modern Veterinary Practice** 5(10): 758-759.

Valverde M, Ramírez J, Montes de Oca L, Goris M, Ahmed N, Hartskeerl R (2008) Arenal, a new *Leptospira* serovar of serogroup Javanica, isolated from a patient in Costa Rica. **Infection, Genetics and Evolution** 8: 529-33

Vasconcellos SA, Oliveira CFJ, Moraes ZM, Baruselli PS, Amaral R, Pinheiro SR, Ferreira F, Ferreira-Neto JS, Schönberg A, Hartskeerl RA (2001) Isolation of *Leptospira santarosai*, serovar guaricura from buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Vale do Ribeira, São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology** 32: 298–300.

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** 163(7): e2752.

Vijayachari P, Sugunan AP, Shriram AN (2008) Leptospirosis: An emerging global public health problem. **Journal of Biosciences** 33: 557–569.

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology** 73(2): 697-703.

WHO - World Health Organization (2003) *International Leptospirosis Society. Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control*. Geneva. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42667/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.23.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 05 abr. 2018.

Yang CW (2007) Leptospirosis in Taiwan. **Chang Gung Medical Journal** 30(2): 109-115.

Yasuda P, Steigerwalt A, Sulzer K, Kaufmann A, Rogers F, Brenner D (1987) Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with proposals for seven new *Leptospira* species. **Microbiology Society Journals** 37: 407-415.

CAPÍTULO 5. Análise das inferências filogenéticas de cinco isolados de *Leptospira interrogans* e *L. santarosai* de suíno com base nas sequências nucleotídicas dos genes 16s e secY

Resumo - Para melhor compreensão da epidemiologia da leptospirose é necessário conhecer os sorovares e hospedeiros presentes, o que só foi obtido com precisão, com o isolamento e a tipificação das leptospiros. O objetivo do trabalho foi realizar caracterização e análise do genoma dos isolados obtidos de suínos abatidos no Estado de São Paulo no ano de 2016. Para isso, 5 isolados de 1.054 culturas foram obtidos de amostras de suínos clinicamente saudáveis, oriundos de granjas das regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil. As amostras de urina e rim foram semeadas em meios de cultivo, e os isolados obtidos foram caracterizados pelas técnicas de sorogrupagem, PCR (Polymerase Chain Reaction), VNTR (variable number of tandem repeats), sequenciamento nucleotídico dos genes *rrs* e *secY* e análises de inferências filogenéticas. Dos meios de cultura de urina e amostra renal, cinco isolados foram obtidos, nomeados de Unesp01 a Unesp05 e sorogrupo como pertencentes aos sorogrupos Icterohaemorrhagiae, Autumnalis e Sejroe. Com os dados do sequenciamento nucleotídico e dos três modelos evolutivos baseados nos genes 16S, *secY* e nos dois genes concatenados, foram definidas as árvores filogenéticas. As árvores obtidas por análise bayesiana foram congruentes na sua topologia geral e os clados foram suportados por altos valores de probabilidade posterior. Dos cinco isolados, três ficaram agrupados no clado da *L. interrogans* e um no clado da *Leptospira santarosai*. Com a associação dos resultados encontrados nas técnicas utilizadas no trabalho foi observado que os isolados Unesp foram agrupados com outras leptospiros da mesma espécie, sorogrupo e região do isolamento, o que permite fazer uma hipótese de que fatores epidemiológicos como a região podem influenciar a evolução das leptospiros, dado este, importante para a compreensão do agente etiológico e o desenvolvimento de planos de ações de controle e prevenção mais efetivos para a leptospirose.

Palavras-chave: Leptospirose; Epidemiologia, Inferência Bayesiana; Genes Concatenados; Árvore Filogenética.

Introdução

A leptospirose é uma doença cosmopolita, causada por diferentes sorovares de *Leptospira* spp., geralmente transmitida pelo contato com ambiente contaminado com a urina de um animal infectado (Acha e Szyfres, 2003). É uma das mais importantes zoonoses do mundo (Picardeau et al., 2014), por ser uma doença ambiental e ocupacional (Durski et al., 2014), com a necessidade de uma visão integrada dentro da interface animal-humano-ecossistema, o que, muitas vezes, torna-se um grande desafio, pela necessidade de estabelecer os principais reservatórios, a fim de avaliar a magnitude da doença (Schneider et al., 2013; Sanchez et al., 2016).

É um importante problema de saúde pública, no entanto, mesmo tendo potencial epidêmico (Picardeau et al., 2014), é muitas vezes negligenciada, sendo subdiagnosticada e subnotificada (Izurieta et al., 2008), devido às apresentações clínicas não específicas da doença, facilmente confundida com outras bacterioses e viroses (Alonso et al., 2000). Graças a sua complexidade, é necessária uma compreensão com esforços multidisciplinares, envolvendo a dinâmica de transmissão, possíveis hospedeiros, presença de sorovares patogênicos e outros dados que possam levar ao seu entendimento (Durski et al., 2014).

Para melhor compreensão da doença é necessário utilizar métodos de diagnóstico adequados, como isolamento e sorologia (Levett, 2001). Com a evolução das técnicas, o cultivo e o isolamento abrem mais possibilidades para o entendimento da evolução das doenças, por permitirem a tipificação da sorovariedade presente na região (Brocchieri, 2001; Chiareli et al., 2012). Análises filogenéticas são parte das análises exploratórias, capazes de mostrar o caminho evolutivo e epidemiológico de agentes etiológicos (Felsenstein, 1978), abordagem está, importante, pois as bactérias se multiplicam rapidamente, apresentam taxas elevadas de mutações e recombinações gênicas, susceptíveis de serem processados pela seleção natural, que pode agir a favor de novas variantes, bem como de outras já existentes em um dado lugar e momento (Bhullar et al., 2012). Ao final das avaliações é possível converter informações obtidas nas sequências em uma árvore de diagramas que apresentam hipóteses de relações evolutivas entre

organismos. Diante disto, o objetivo do trabalho foi realizar sequenciamento nos genes 16S e secY, VNTR e análise das inferências filogenéticas dos isolados obtidos de suínos abatidos no Estado de São Paulo, no ano de 2016, tendo em vista que não há estudo de filogenia de leptospiros isoladas de suínos no Brasil.

Material e Métodos

Local do estudo

A suinocultura paulista é formada, principalmente, por produtores independentes, não integrados aos abatedouros. Os abatedouros do Estado recebem suínos de várias propriedades e regiões, especializando-se na produção de carne resfriada para o mercado local e/ou na de embutidos. No presente estudo, foram coletadas 980 amostras de urina e 74 rins de suínos adultos, clinicamente saudáveis, oriundos de granjas das regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul, especificamente dos municípios de Monte Azul Paulista, Monte Alto, Moji-Mirin e Jaguariuma, no Estado de São Paulo, nos municípios de Nova Santa Rosa e Laranjeiras do Sul, no Estado do Paraná, do município de Salto Veloso, no Estado de Santa Catarina, e do município de Campo Grande, no Estado do Mato Grosso do Sul. Esses animais foram abatidos em 3 matadouros-frigoríficos localizados na Mesorregião de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, no ano de 2016.

O estudo foi aprovado, sob N°12276/15, pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Câmpus de Jaboticabal/Unesp – SP, Brasil, e segue os princípios dos três erres, descrito por Russell e Burch (1959), evitando o uso de animais sencientes exclusivamente para o trabalho. As amostras foram provenientes de animais que já seriam abatidos, de materiais que seriam descartados, sem nenhum tipo de influência na escolha dos animais ou conhecimento sobre o status sanitário da propriedade.

Foi realizado um cálculo de tamanho mínimo da amostra com base em fórmula encontrada em Thrusfield (2005), utilizando como prevalência esperada o valor de 50% e 95% de confiança. Foram coletadas as amostras de urina de todos os animais cuja bexiga permaneceu íntegra ao final da evisceração, assim como os rins

que não haviam sido cortados, contaminados com fluidos estomacais ou perdido a membrana verdadeira.

Colheita do material

As amostras de urina foram coletadas por cistocentese na linha de abate, na quantidade de 5 a 10 mL/animal, com auxílio de seringas esterilizadas. Os rins foram colhidos durante a fase de evisceração e armazenados individualmente em sacos de polipropileno esterilizados. No primeiro momento, a urina foi armazenada em temperatura ambiente, e os rins armazenados em caixa isotérmica contendo gelo, para manutenção da temperatura entre 2°C e 8°C, para, em condições assépticas, serem semeados no meio de cultivo.

Isolamento de *Leptospira* spp. de urina e de tecido renal

Um fragmento de aproximadamente 3 cm³ da região do parênquima renal foi extraído. Cada fragmento de tecido renal foi colocado dentro de coletor universal esterilizado, triturado, e adicionados 10 mL de salina. O conteúdo foi homogeneizado e deixado por uma hora em repouso, com o intuito de separar o sobrenadante do precipitado. O sobrenadante foi coletado com o auxílio de uma seringa descartável esterilizada e semeado acoplado a um filtro de 0,22 µm (filtro de seringa KASVI, k18-230, PES membrane, Max.Pressure: 4,5 bars), assim com a urina.

Por amostra, foram utilizados dois tubos de meios de cultura: um contendo meio semissólido, Fletcher, e outro com meio líquido, EMJH (Thiermann, 1984; Ellis, 1982) inicialmente com antibiótico 5-fluorouracil e ácido nalidíxico (Miraglia et al., 2009), contendo 10 mL de meio cada. Por tubo, foram inoculadas aproximadamente cinco gotas de filtrado, e após 24 horas foi realizado um repique, do meio com antibiótico para um meio sem antibiótico, tendo como inóculo 10% do volume do meio a semear. Os tubos foram armazenados em estufa tipo B.O.D. a 29°C ± 1°C e examinadas visualmente e em microscopia de campo escuro semanalmente, por até 24 semanas.

Durante esse período, as amostras que foram demonstrando anel de opalescência ou nuvem de multiplicação foram separadas, e sua pureza avaliada. Nos casos em que havia contaminação, foi feito o repique para um tubo contendo o mesmo tipo de meio da amostra suspeita (Fletcher ou EMJH) com antibiótico 5-fluorouracil e ácido nalidíxico (Miraglia et al., 2009), e após 24 horas a mesma amostra foi repicada em meio sem antibiótico (Thiermann, 1984; Ellis et al., 1982); o processo foi repetido semanalmente até obter suspeitos sem contaminantes.

Dos meios com suspeita de multiplicação de *Leptospira* spp. foi retirada uma alíquota para observação em microscopia de campo escuro com objetiva de 10x (Faine, 1994), quando observada multiplicação bacteriana semelhante a uma espiroqueta, um repique foi feito em meio Fletcher e EMJH sem antibiotico para utilização nas análises de identificação.

Sorogrupagem

Todos os isolados obtidos foram testados contra 32 antissoros (Andamana, Bratislava, Australis, Autumnalis, Castellonis, Bataviae, Canicola, Celledoni, Codice, Cynopteri, Djasiman, Grippotyphosa, Hebdomadis, Holland, Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Lousiana, Lyme, Manhao, Mini, Panama, Pomona, Pyrogenes, Pinchang, Sarmin, Hardjoprajitno, Hardjobovis, Wolffi, Patoc, Shermani e Tarassovi), correspondentes a 28 sorogrupos (Andamana, Australis, Autumnalis, Ballum, Bataviae, Canicola, Celledoni, Codice, Cynopteri, Djasiman, Grippotyphosa, Hebdomadis, Holland, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Lousiana, Lyme, Manhao, Mini, Panama, Pomona, Pyrogenes, Ranarum, Sarmin, Sejroe, Semarang, Shermani e Tarassovi), fornecidos pelo Royal Tropical Institute (KIT, Amsterdã) seguindo as recomendações de Faine e colaboradores (1999).

Extração de DNA e reação em cadeia da polimerase

Culturas de *Leptospira* spp. com multiplicação bacteriana entre 10^7 e 10^8 células por mL foram submetidas a extração de DNA com Wizard SV Genomic DNA Purification System® (Promega), conforme instruções do fabricante.

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional com o gene lipL32 foi realizada para detecção de leptospiros patogênicos, com os primers LipL32-45F (5'-AAG CAT TAC CGC TTG TGG TG-3') e LipL32-286R (5'-GAA CTC CCA TTT CAG CGA TT-3') (Stoddard et al., 2009). A reação foi realizada com volume final de 25 µL, 10x de buffer, 2,5 mM de MgCl₂, 0,6 picomol de cada primer, 25 mM de dNTPs, 1 U de GoTaq® DNA Polymerase (Promega) e 30 ng de DNA. O programa de temperaturas incluiu uma desnaturação inicial de 94°C por dois minutos, seguida de quarenta ciclos de 94°C por trinta segundos, 53°C por trinta segundos, 72°C por um minuto, e extensão final de 72°C por cinco minutos.

A determinação da espécie de *Leptospira* foi realizada por meio de PCR e sequenciamento nucleotídico dos genes *rrs* (16S rRNA) e *secY*. Os primers utilizados para a amplificação do 16S foram 16S fD1 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' e 16S rP2 5'-ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT-3' (Weisburg et al., 1991). A reação foi realizada com volume final de 25 µL, buffer 10x, 2,0 mM de MgCl₂, 0,6 picomol de cada primer, 25 mM de dNTPs, 0,5 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e 30 ng de DNA. O programa de temperaturas incluiu uma desnaturação inicial de 95°C por cinco minutos, seguida de 35 ciclos de 95°C por dois minutos, 42°C por trinta segundos, 72°C por três minutos, e extensão final de 72°C por dez minutos. Os primers utilizados para a amplificação do *secY* foram *secYF* 5'-ATG CCG ATC ATT TTT GCT TC-3' e *secYR* 5'-CCG TCC CTT AAT TTT AGA CTT CTT C-3' (Ahmed et al., 2006). A reação foi realizada com volume final de 25 µL, buffer 10x, 1,5 mM de MgCl₂, 0,6 picomol de cada primer, 25 mM de dNTPs, 0,5 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e 30 ng de DNA. O programa de temperaturas incluiu uma desnaturação inicial de 95°C por cinco minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por trinta segundos, 58°C por trinta segundos, 72°C por um minuto, e extensão final de 72°C por sete minutos.

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

Sequenciamento nucleotídico e inferências filogenéticas

Os produtos de PCR foram purificados com GFX PCR DNA Gel Band Purification kit (GE HealthCare). A reação de sequenciamento nucleotídico foi realizada utilizando o BigDye Terminator v3.1 kit (Applied Biosystems). O sequenciamento nucleotídico do gene *rrs* incluiu a utilização de primers internos, Lepto16SF1 5'-GGC GGY GCT CTT WAW CAT-3' e Lepto16SR2 5'-ATC CCG TTC ACT ACC CAC GC-3' (Fenner et al., 2010), além dos anteriormente descritos. A eletroforese capilar foi realizada em um sequenciador automático ABI 3730 (Applied Biosystems). As sequências foram editadas utilizando o programa BioEdit v7.5.0.2. (Hall, 1999).

Além das sequências geradas neste estudo também foram obtidas sequências disponíveis para os genes *rrs* e SecY no GenBank /NCBI (Tabela 1 e 2). Foram selecionadas 93 sequências para o gene *rrs* e 92 do SecY (Tabela 1) de espécies de *Leptospira* e sequências dos mesmos genes de 27 espécies diferentes como grupo externo (27 *rrs* e 6 secY) (Tabela 2). As sequências foram alinhadas pelo MAFFT v7 (Kato et al., 2002) construindo-se três matrizes, uma para cada gene e uma de evidência total com as espécies com os dois genes, com o programa BioEdit v7.5.0.2. (Hall, 1999), e adicionadas máscaras onde as sequências não estavam disponíveis (*missing data* = "?") (Wiens, 2006).

Utilizando o software jModelTest versão 2.1.1 (Darriba et al., 2012), foram gerados modelos evolutivos para os três conjuntos de dados (secY, 16S e os 2 genes concatenados), e para escolha dos modelos foi empregado o critério AIC, Akaike Information Criterion (Akaike, 1973). O AIC estima a qualidade relativa de um modelo estatístico, em relação a cada um dos outros modelos gerados, fornecendo um critério para a seleção de modelos (Burnham et al., 2011).

O modelo para o gene *rrs* foi TIM3+I+G, para o secY HKY+I+G (Hasegawa et al., 1985) e para a matriz concatena TIM2+I+G seguiu-se com uma Inferência Bayseana (IB) na plataforma CIPRES (Miller et al., 2010) pelo MrBayes versão 3.2.2 (Huelsenbeck e Ronquist, 2001), conduzida com 3×10^7 de gerações, com as probabilidades posteriores estimadas por meio do algoritmo MCMC, utilizando-se quatro cadeias quentes. Foram amostradas árvores a cada 100 gerações (1 árvore/100 geração), com descarte de 25% das amostras iniciais (burnin).

As árvores obtidas foram editadas através dos programas TreeGraph 2 (Stöver e Muller, 2010) e FigTree v1.3.1 (Rambaut, 2009).

Tabela 1. Lista de espécies incluídas nas análises com suas respectivas informações de acesso do GenBank, por marcador molecular.

Espécie	Sorovar	Estirpe	Acesso GenBank	
			Rrs	secY
<i>Leptospira interrogans</i>	Copenhageni/ Icterohaemorrhagiae	Unesp01	MH686119	MH683045
<i>Leptospira interrogans</i>	Autumnalis	Unesp02	MH686120	H683046
<i>Leptospira santarosai</i>	Não determinado - Sorogrupo Sejroe	Unesp03	MH686121	H683047
<i>Leptospira interrogans</i>	Autumnalis	Unesp04	MH686122	H683048
<i>Leptospira interrogans</i>	Copenhageni/ Icterohaemorrhagiae	Unesp05	MH686123	H683049
<i>Leptospira alexanderi</i>	Manzhuang	A23	AY996803.1	-
<i>Leptospira alexanderi</i>	Nanding	M 6901	AY996804.1	-
<i>Leptospira alexanderi</i>	Mengla	A85	DQ991481.1	-
<i>Leptospira alexanderi</i>	-	Manhao 3_DB53	JQ988836.1	-
<i>Leptospira alstonii</i>	Pingchang	80-412	DQ991480.1	-
<i>Leptospira alstonii</i>	Sichuan	79601	AY631881.1	-
<i>Leptospira alstonii</i>	-	GWTS #1	CP015217.1:21556 63-2157093	-
<i>Leptospira biflexa</i>	Tororo	mutant 6/1993	Z98590.1	-
<i>Leptospira biflexa</i>	Andamana	CH 11	FJ154577.1	-
<i>Leptospira borgpetersenii</i>	Tarassovi	Perepelicin	FJ154595.1	EU358057.1
<i>Leptospira borgpetersenii</i>	Ceylonica	Piyasena	AY461860.1	EU358041.1
<i>Leptospira borgpetersenii</i>	Mini	Sari	AY461859.1	EU358032.1
<i>Leptospira borgpetersenii</i>	-	201003760	JN683877.1	JN683945.1
<i>Leptospira borgpetersenii</i>	-	200701204	JN683861.1	JN683929.1
<i>Leptospira borgpetersenii</i>	Poi	Poi	FJ154597.1	EU358007.1
<i>Leptospira borgpetersenii</i>	Ballum	Mus 127	AY631884.1	EU357953.1
<i>Leptospira borgpetersenii</i>	Javanica	DB46	JQ988849.1	EU358040.1
<i>Leptospira broomii</i>	-	5399	NR_043200.1	-
<i>Leptospira broomii</i>	-	SSI 5402-98	Y19243.1	-
<i>Leptospira broomii</i>	-	DB47	JQ988850.1	-
<i>Leptospira broomii</i>	-	L065	AY792329.1	-
<i>Leptospira fainei</i>	Hurstbridge	BUT 6	AY631885.1	-
<i>Leptospira idonii</i>	-	Eri-1	NR_114336.1	-
<i>Leptospira inadai</i>	-	LYME	Z21634.1	-
<i>Leptospira inadai</i>	Kaup	LT 64-68	AY631887.1	-
<i>Leptospira interrogans</i>	Hardjo	Hardjoprajitno	AM050568.1	EU357983.1
<i>Leptospira interrogans</i>	Manilae	LT398	FJ154545.1	EU358049.1
<i>Leptospira interrogans</i>	Bratislava	Jez Bratislava	FJ154547.1	EU357939.1
<i>Leptospira interrogans</i>	Rachmati	Rachmat	FJ154548.1	EU357944.1

Espécie	Sorovar	Estirpe	Acesso GenBank	
			Rrs	secY
<i>Leptospira interrogans</i>	Bataviae	DB59	JQ988841.1	-
<i>Leptospira interrogans</i>	Bataviae	Van Tienen	-	EU357956.1
<i>Leptospira interrogans</i>	Perameles	Bandicoot 343	AB368965.1	EU358034.1
<i>Leptospira interrogans</i>	Copenhageni	Fiocruz L1-130	AE016823.1:18624 60-1863923	AE016823.1:3458746 -3460131
<i>Leptospira interrogans</i>	Hebdomadis	Hebdomadis	AM050570.1	EU357974.1:6-1386
<i>Leptospira interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	RGA	AY631894.1	EU357997.1
<i>Leptospira interrogans</i>	Pomona	Pomona	AY996800.1	EU358013.1:2-1382
<i>Leptospira interrogans</i>	Lai	IPAV	CP001221.1:24167 64-2418227	CP001221.1:770851- 772231
<i>Leptospira interrogans</i>	Linhai	56609	CP006723.1:31013 35-3102798	CP006723.1:3522430 -3523810
<i>Leptospira interrogans</i>	Copenhageni/Icteroh aemorrhagiae	Piscina	CP018146.1:18556 92-1857155	CP018146.1:3415253 -3416638
<i>Leptospira interrogans</i>	Copenhageni	FDAARGOS_203	CP020414.1:35203 70-3521793	CP020414.1:1468253 -1469638
<i>Leptospira interrogans</i>	Djasiman	Djasiman	FJ154550.1	EU357947.1:6-1386
<i>Leptospira interrogans</i>	Muenchen	Muenchen C90	FJ154565.1	EU357938.1:6-1386
<i>Leptospira interrogans</i>	Saxkoebing	Mus-24	KR107202.1	EU357988.1
<i>Leptospira interrogans</i>	Copenhageni	M-20	KY000352.1	-
<i>Leptospira interrogans</i>	-	Australis-DB42	JQ988863.1	-
<i>Leptospira interrogans</i>	Canicola	LO-3	KU053945.1:21- 1484	-
<i>Leptospira interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	M9/05	KU053947.1:21- 1485	-
<i>Leptospira interrogans</i>	Fugis	Fudge	-	EU357940.1:6-1386
<i>Leptospira interrogans</i>	Mooris	Moore	-	EU357945.1:6-1386
<i>Leptospira interrogans</i>	Sentot	Sentot	-	EU357946.1:6-1386
<i>Leptospira interrogans</i>	Gurungi	Gurung	-	EU357948.1:6-1386
<i>Leptospira interrogans</i>	Weerasinghe	Weerasinghe	-	EU357949.1:6-1386
<i>Leptospira interrogans</i>	Benjamini	Benjamin	-	EU357967.1
<i>Leptospira interrogans</i>	Kuwait	136/2/2	-	EU357970.1:6-1386
<i>Leptospira interrogans</i>	Medanensis	Hond HC	-	EU357984.1:6-1386
<i>Leptospira interrogans</i>	Wolffi	3705	-	EU357985.1:2-1382
<i>Leptospira interrogans</i>	Haemolytica	Marsh	-	EU357989.1:4-1384
<i>Leptospira interrogans</i>	Ricardi	Richardson	-	EU357990.1:4-1384
<i>Leptospira interrogans</i>	Geyaweera	Geyaweera	-	EU357993.1:6-1386
<i>Leptospira interrogans</i>	Birkini	Birkin	-	EU358000.1:2-1382
<i>Leptospira interrogans</i>	Budapest	PV 1	-	EU358004.1
<i>Leptospira interrogans</i>	Monjakov	Monjakov	-	EU358014.1:6-1386
<i>Leptospira interrogans</i>	Gem	Simon	-	EU358039.1:8-1389
<i>Leptospira interrogans</i>	Camlo	LT 64-67	-	EU358053.1:12-1392
<i>Leptospira kirschneri</i>	Grippotyphosa	Moskva	FJ154572.1	EU358028.1
<i>Leptospira kirschneri</i>	Galtoni	LT1014	-	EU358025.1
<i>Leptospira kirschneri</i>	Mozdok	61H	KP114456.1	KP114457.1
<i>Leptospira kirschneri</i>	Cynopteri	3522	NR_043051.1	EU358027.1
<i>Leptospira kirschneri</i>	Bim	1051	AY996802.1	EU357952.1

Espécie	Sorovar	Estirpe	Acesso GenBank	
			Rrs	secY
<i>Leptospira kirschneri</i>	Bafani	Bafani	DQ991477.1	EU357962.1
<i>Leptospira kirschneri</i>	Ratnapura	Wumalasena	DQ991479.1	EU357972.1
<i>Leptospira kirschneri</i>	Kambale	Kambale	FJ154562.1	EU358030.1
<i>Leptospira kirschneri</i>	Erinaceauriti	Erinaceauriti	FJ154560.2	EU358021.1
<i>Leptospira kmetyi</i>	Malaysia	Bejo-Iso9	NR_041544.1	-
<i>Leptospira licerasiae</i>	Varillal	VAR 010	NR_044310.1	-
<i>Leptospira mayottensis</i>	-	200901122	JN683863.1	JN683931.1
<i>Leptospira mayottensis</i>	-	2014TE MDI222	KT338860.1	KT338858.1
<i>Leptospira meyeri</i>	Ranarum	Iowa City Frog	NR_043045.1	-
<i>Leptospira meyeri</i>	Semaranga	Veldrat Semarang 173	FJ154599.1	-
<i>Leptospira noguchii</i>	Argentiniensis	Peludo	-	EU357960.1
<i>Leptospira noguchii</i>	Carimagua	9160	-	EU358068.1
<i>Leptospira noguchii</i>	Huallaga	M7	DQ991499.1	EU357950.1
<i>Leptospira noguchii</i>	Autumnalis	Fort Bragg	U12671.1	-
<i>Leptospira noguchii</i>	Australis	Hook	EU349496.1	-
<i>Leptospira noguchii</i>	Bataviae	Cascata	EU349495.1	-
<i>Leptospira noguchii</i>	Orleans	LSU 2580	FJ154588.1	-
<i>Leptospira noguchii</i>	Nicaragua	1011	FJ154574.1	-
<i>Leptospira noguchii</i>	Panama	CZ 214 K	FJ154582.1	-
<i>Leptospira santarosai</i>	Georgia	LT117	AY996805.1	EU358033.1
<i>Leptospira santarosai</i>	Shermani	1342K	FJ154576.1	EU358055.1
<i>Leptospira santarosai</i>	Canalzonae	CZ288	FJ154584.1	EU358029.1
<i>Leptospira santarosai</i>	Alexi	HS616	FJ154585.1	EU358047.1
<i>Leptospira santarosai</i>	Bakeri	LT79	FJ154589.1	EU358058.1
<i>Leptospira santarosai</i>	Trinidad	TRVL34056	FJ154598.1	EU358035.1
<i>Leptospira santarosai</i>	Kobbe	CZ320	DQ991495.1	EU358024.1
<i>Leptospira santarosai</i>	Bananal	10ACAP	KJ946436.1	KF366254.1
<i>Leptospira santarosai</i>	Tropica	CZ 299	FJ154583.1	EU358016.1
<i>Leptospira santarosai</i>	Weaveri	CZ390	DQ991496.1	EU358005.1
<i>Leptospira santarosai</i>	-	INCIENSA04	KC492821.1	KC492823.1
<i>Leptospira santarosai</i>	Atlantae	LT81	U12672.1	EU358059.1
<i>Leptospira santarosai</i>	Balboa	735U	-	EU357958.1
<i>Leptospira santarosai</i>	Brasiliensis	An 776	-	EU357959.1
<i>Leptospira santarosai</i>	Naparuca	NN-1	-	EU357971.1
<i>Leptospira santarosai</i>	Maru	CZ 285	-	EU357977.1
<i>Leptospira santarosai</i>	Borincana	HS 622	-	EU357978.1
<i>Leptospira santarosai</i>	Beye	1537U	-	EU357981.1
<i>Leptospira santarosai</i>	Tabaquite	TRVL 3214	-	EU357982.1
<i>Leptospira santarosai</i>	Gorgas	1413 U	-	EU357991.1
<i>Leptospira santarosai</i>	Guaicurus	Bov. G	-	EU357994.1
<i>Leptospira santarosai</i>	Goiano	Bovino 131	-	EU357995.1
<i>Leptospira santarosai</i>	Vargonicas	24	-	EU358011.1

Espécie	Sorovar	Estirpe	Acesso GenBank	
			Rrs	secY
<i>Leptospira santarosai</i>	Rio	Rr 5	-	EU358042.1
<i>Leptospira santarosai</i>	Bagua	MW-12	-	EU358046.1
<i>Leptospira santarosai</i>	Cenepa	MW-2	-	EU358054.1
<i>Leptospira santarosai</i>	Gatuni	1473 K	-	EU358061.1
<i>Leptospira santarosai</i>	Atchafalay	LSU 1013	-	EU358062.1
<i>Leptospira terpstrae</i>	Hualin	LT 11-33	NR_115294.1	-
<i>Leptospira weilii</i>	Coxi	Cox	FJ154581.1	EU358009.1
<i>Leptospira weilii</i>	Langati	M39090	DQ991488.1	EU358065.1
<i>Leptospira weilii</i>	Celledoni	Celledoni	NR_043044.1	-
<i>Leptospira weilii</i>	-	clone rrs-122069	-	KF297612.1
<i>Leptospira wolbachii</i>	Codice	CDC	AY631879.1	-
<i>Leptospira wolbachii</i>	Gent	Wa Gent	AY631890.2	-
<i>Leptospira wolffii</i>	-	LS0914U	KC662454.1	-
<i>Leptospira wolffii</i>	Khorat	Khorat-H2	NR_044042.1	-
<i>Leptospira yanagawae</i>	Saopaulo	Sao Paulo	NR_115293.1	-

Tabela 2. Lista de espécies incluídas nas análises como grupo externo e sua informação de acesso do GenBank por marcador molecular.

Familia	Espécie	Estirpe	Acesso GenBank	
			Rrs	secY
Bacillaceae	<i>Bacillus licheniformis</i>	BCRC 11702	NR_116023.1	X70087.1
Borreliaceae	<i>Borrelia coriaceae</i>	Co53	NR_121718.1	-
Borreliaceae	<i>Borrelia hermsii</i>	-	U42292.1	-
Borreliaceae	<i>Borrelia miyamotoi</i>	HT31	D45192.1	-
Borreliaceae	<i>Borrelia parkeri</i>	6230	AF307099.1	-
Brachyspiraceae	<i>Brachyspira alvinipulli</i>	Ant230/3/12	KR809390.1	-
Brachyspiraceae	<i>Brachyspira canis</i>	A69/06	GU189366.1	-
Brachyspiraceae	<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	R1	U23035.1	EU555160.1
Brachyspiraceae	<i>Brachyspira innocens</i>	AN315/04	EF164983.1	-
Brachyspiraceae	<i>Brachyspira murdochii</i>	56-150	NR_027570.1	CP001959.1:2109641-2110978
Brachyspiraceae	<i>Brachyspira pilosicoli</i>	NR998	LC259310.1	CP002873.1:2094467-2095804
Brachyspiraceae	<i>Brachyspira pulli</i>	AN3382/1/03	EF164985.1	-
Brevinemataceae	<i>Brevinema andersonii</i>	-	M59179.1	-
Leptospiraceae	<i>Turneriella parva</i>	DSM 21527	NR_074444.1	-
Leptospiraceae	<i>Leptonema illini</i>	3055	AY714984.1	-
Leptospiraceae	<i>Leptonema illini</i>	3055	NR_119299.1	-
Spirochaetaceae	<i>Spirochaeta alkalica</i>	Z-7491	NR_026301.1	-
Spirochaetaceae	<i>Spirochaeta americana</i>	ASpG1	NR_028820.1	-
Spirochaetaceae	<i>Spirochaeta sp.</i>	JC202	HF968430.2	-
Spirochaetaceae	<i>Spirochaeta sphaeroplastigenens</i>	JC133	NR_108888.1	-
Spirochaetaceae	<i>Treponema médium</i>	OMZ 805	KT192148.1	-
Spirochaetaceae	<i>Treponema sp. feline oral</i>	210 clone UJ057	KM462180.1	-
Spirochaetaceae	<i>Treponema sp. canine oral</i>	171 clone QC088	JN713336.1	-
Spirochaetaceae	<i>Treponema sp. Oral</i>	239 clone U080A	GU408738.1	-
Spirochaetaceae	<i>Treponema vincentii</i>	OMZ 906	KT192159.1	-
Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	DQ630753.1	U96620.1
Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus carnosus</i>	-	LN610170.1	X70086.1

Variable-Number Tandem-Repeat (VNTR)

A técnica VNTR foi realizada na tentativa de genotipar as estirpes de *Leptospira*. O protocolo para *L. interrogans* envolveu três alvos genéticos: VNTR4 (primers F 5'-CAA AAT CAG TCA CTA CCC TG-3' e R 5'-CTT TGT TGG AGC GCA ATC TC-3'); VNTR7 (primers F 5'-TCA TCT GCT CCG GAG ATT CG-3' e R 5'-TCC CTC CAC AGG TTG TCT TG-3'); e VNTR10 (primers F 5'-TCC AAA ATT CAG CCC

TCA AG-3' e R 5'-GAC GCT TGG CAT TTG TAT CC-3'), conforme (Majed et al., 2005). A reação foi realizada com volume final de 25 µL, buffer 10x, 1,5 mM de MgCl₂, 0,6 picomol de cada primer, 25 mM de dNTPs, 0,5 U de Taq polymerase (Amersham) e 30 ng de DNA. O programa de temperaturas incluiu uma desnaturação inicial de 94°C por cinco minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por trinta segundos, 55°C por trinta segundos, 72°C por um minuto e trinta segundos, e extensão final de 72°C por dez minutos. A eletroforese em gel de agarose 1,5%, utilizando o corante GelRed (Invitrogen), foi realizada, e os resultados foram visualizados sob luz ultravioleta. O número de repetições de cada alvo de VNTR foi calculado conforme Salaüm e colaboradores (2006).

O protocolo para *L. santarosai* também envolveu três alvos genéticos: VNTR S1 (primers F 5'- CGA GTG AAC CTT GCT TGA CA-3' e R 5'- CGG TCA TAG GCA TAG TGG GA-3'); VNTR S2 (primers F 5'- AAG ACC CTA CAA GCC GCT TC-3' e R 5'- TCC ATA CCC GGT CCT TTA CT-3'); e VNTR S10 (primers F 5'- GCG GAA AAG TCG TGA ATG GA-3' e R 5'- AAC TCA CAA CCC TCC CGA AA-3'), conforme Hamond et al. (2015). A reação foi realizada com volume final de 25 µL, buffer 10x, 4,0 mM de MgCl₂, 0,6 picomol de cada primer, 25 mM de dNTPs, 0,5 U de Taq polymerase (Amersham) e 30 ng de DNA. O programa de temperaturas incluiu uma desnaturação inicial de 94°C por cinco minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por trinta segundos, 55°C por trinta segundos, 72°C por um minuto e trinta segundos, e extensão final de 72°C por dez minutos. Uma alteração no protocolo foi realizada: temperatura de anelamento de 60°C para o alvo genético VNTR S2. A eletroforese em gel de agarose 1,5%, utilizando o corante GelRed (Invitrogen), foi realizada, e os resultados foram visualizados sob luz ultravioleta.

Resultados e Discussão

Isolamento

Houve isolamento de cinco culturas das 1.054 analisadas, (Tabela 3), sendo quatro de amostras de urina e uma de amostra de tecido renal, totalizando êxito em 0,4% (4/980) das culturas de origem de amostra de urina e 1,35% (1/74) das culturas de origem de tecido renal. O número pequeno de isolados diante da

quantidade de amostras é devido a vários fatores, como a ausência de conhecimento sobre o status sanitário da leptospirose nas granjas de origem dos animais, além de dificuldades inerentes ao isolamento, devido a fatores como o sorovar infectante e o tipo de meio que melhor supre suas necessidades *in vitro* (Thiermann, 1984), o tempo decorrido entre a morte do animal e processamento da amostra, e o tipo de material escolhido para o cultivo (Shimabukuro et al., 2003), além do crescimento lento (Levett, 2001) e do pequeno número de células bacterianas presentes nos órgãos e na urina, que, muitas vezes, mesmo presentes não se desenvolvem (Killinger et al., 1976).

No entanto, mesmo com as dificuldades, é importante realizar o isolamento, pois ele exerce um papel de relevância, principalmente no controle da infecção, pois permite o conhecimento exato dos diferentes sorovares existentes em determinada região (Freitas et al., 2004). Nesse tocante, o isolamento em cinco amostras de suínos, de sanidade desconhecida, representa significativo ganho no conhecimento de quais sorovares estão infectando esses animais e circulando no ambiente.

Os isolados foram nomeados como Unesp01, Unesp02, Unesp03, Unesp04 e Unesp05, de acordo com a ordem dos isolamentos, levando em conta o tempo para obter multiplicação bacteriana suficiente para realizar a confirmação do isolamento. No isolado Unesp03, apesar de em microscópio de campo escuro ser observada multiplicação bacteriana compatível com espiroqueta após três meses de cultivo, o meio estava contaminado e foi necessário um período de cinco meses para a completa descontaminação e multiplicação suficiente para realizar as técnicas para confirmação. Hussaini e Ruby (1976) já tinham descrito a dificuldade do isolamento de leptospiros de tecidos animais e urina, devido à presença de outros microrganismos contaminantes. Muitas vezes, devido ao rápido crescimento dos oportunistas, frente ao da leptospira, que tem o crescimento lento, esta não consegue se desenvolver, nem multiplicar no meio (Terpstra et al., 1985).

Tabela 3. Lista de isolados obtidos de amostras coletadas em matadouros-frigoríficos da Mesorregião de Ribeirão Preto, com a descrição do material biológico coletado, o mês e o ano em que ocorreu a coleta de materiais, mês e ano do êxito no isolamento e o município de origem dos suínos.

Isolado	Material	Mês da coleta/ ano	Mês do isolamento/ ano	Município de origem
Unesp01	Urina	Fevereiro/2016	Maio/2016	Monte Alto – SP
Unesp02	Rim	Abril/2016	Julho/2016	Nova Santa Rosa – PR
Unesp03	Urina	Fevereiro/2016	Maio/2016	Monte Azul Paulista – SP
Unesp04	Urina	Março/2016	Agosto/2016	Moji-Mirin – SP
Unesp05	Urina	Junho/2016	Janeiro/2017	Campo Grande – MS

As amostras foram coletadas em três matadouros-frigoríficos da Mesorregião de Ribeirão Preto, nomeados como estabelecimentos 01, 02 e 03, sendo os isolados Unesp01 e Unesp03 obtidos de amostras coletadas no estabelecimento 01, os isolados Unesp02 e Unesp05 no estabelecimento 02 e o isolado Unesp04 no estabelecimento 03.

Sorogrupagem

Os isolados foram sorogrupados como pertencentes a três sorogrupos diferentes: *Icterohaemorrhagiae*, *Autumnalis* e *Sejroe* (Tabela 4). Os sorogrupos *Icterohaemorrhagiae* e *Autumnalis* estão entre os principais diagnosticados em suínos no Brasil por técnicas sorológicas (Soto et al., 2007). Já em alguns países do continente europeu, os sorogrupos *Icterohaemorrhagiae* e *Sejroe* se destacam como causadores de problemas reprodutivos na suinocultura (Wasiński, 2014), sorogrupos também encontrados por Marchiori Filho e colaboradores (2002) em javalis (*Sus scrofa*) mantidos em cativeiros localizados nos estados de São Paulo e Paraná. Os isolamentos reforçam que estes patógenos estão circulando e infectando suídeos em granjas brasileiras.

Tabela 4. Resultados encontrados na técnica de sorogrupagem dos isolados de *Leptospira*: Unesp01, Unesp02, Unesp03, Unesp04 e Unesp05, detalhando os antíssoros, o sorogrupo e o título da reação.

Amostra	Sorogrupo	Antíssoros					
		Sorovar					
		Autumnali	Copenhageni	Hardjobovis	Hardjoprajitno	Icterohaemorrhagiae	Wolffi
		Títulos					
Unesp01	Icterohaemorrhagiae	-	3.200	-	-	6.400	-
Unesp02	Autumnalis	51.200	-	-	-	-	-
Unesp03	Sejroe	-	-	6.400	12.800	-	1.600
Unesp04	Autumnalis	25.600	-	-	-	-	-
Unesp05	Icterohaemorrhagiae	-	102.400	-	-	25.600	-

Reação em cadeia da polimerase e sequenciamento nucleotídico

A PCR, utilizando como alvo genético o gene *lipL32*, foi positiva em todas os isolados (Figura 1). A *lipL32* é a principal proteína de membrana externa presente na leptospira, responsável por causar disfunções renais, por ter ação mediadora na nefrite túbulo-intersticial, com efeito sobre as células tubulares proximais, causando aumento substancial de expressão gênica e proteica de citocinas pró-inflamatórias, como iNOS, MCP1, RANTES e TNF- α (Yang et al., 2002). O achado do gene *lipL32* indica que a leptospira analisada é patogênica, informação que auxilia no entendimento do agente etiológico e de sua possibilidade de causar a doença no hospedeiro.

Figura 01. Imagem de gel de agarose 1,5% com amplificações do alvo lipL32.

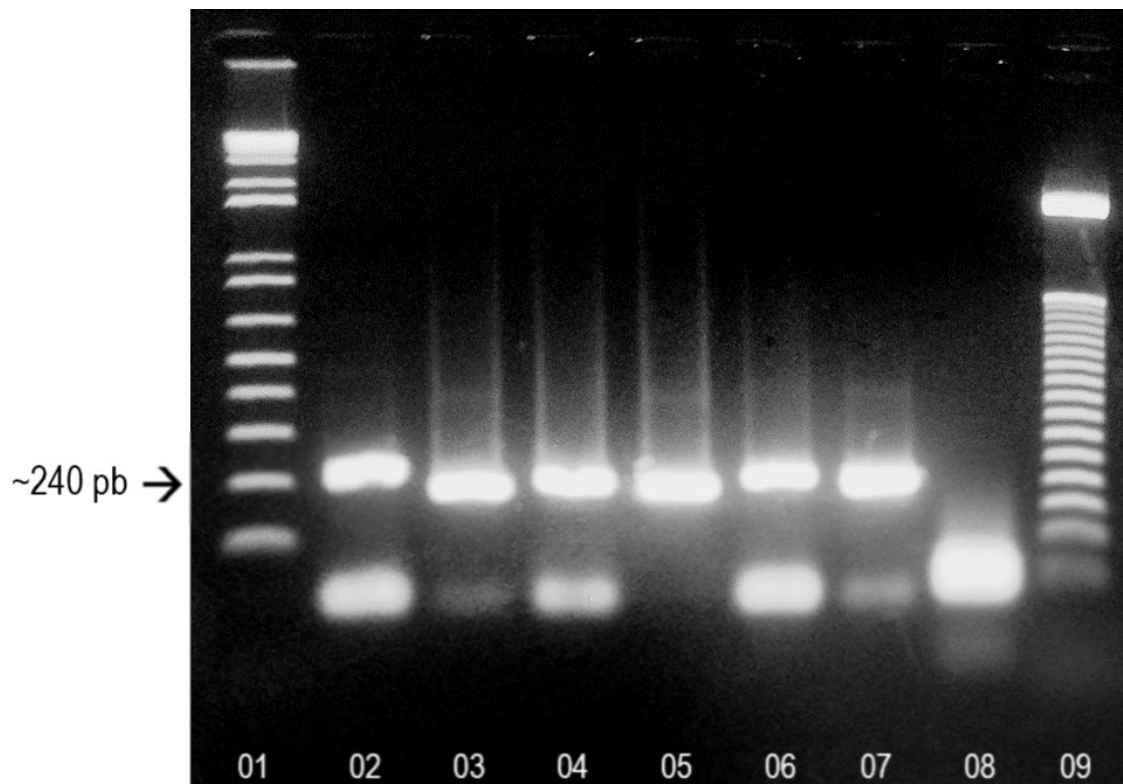


Figura 1 - 01: Marcador molecular; 02: Controle positivo estirpe Fiocruz L1-130; 03: Unesp01; 04: Unesp02; 05: Unesp03; 06: Unesp04; 07: Unesp05; 08: Controle negativo, 09: Marcador molecular.

Genotipagem - VNTR

A genotipagem pela técnica do VNTR para a espécie *L. interrogans* determinou o genótipo em quatro amostras (Tabela 5). O genótipo identificado nas amostras Unesp01 e Unesp05 foi o I3/I6 (VNTR4 = 2; VNTR7 = 1; VNTR10 = 7), descrito por Majed e colaboradores (2005), característico dos sorovares Icterohaemorrhagiae/Copenhageni. Em duas amostras (Unesp02 e Unesp04) identificou-se um genótipo, perfil de VNTR, possivelmente novo, ainda não descrito (VNTR4 = 2; VNTR7 = 19; VNTR10 = 12) (Tabela 5).

Tabela 5. Resultados da técnica VNTR para genotipagem de *L. interrogans*.

Isolado	Número de repetições			Genótipo
	VNTR4	VNTR7	VNTR10	
Unesp01	2	1	7	I3/I6
Unesp02	2	19	12	Novo loci recombinante
Unesp04	2	19	12	Novo loci recombinante
Unesp05	2	1	7	I3/I6

A genotipagem pela técnica de VNTR, para a espécie *L. santarosai*, da amostra Unesp03 (Tabela 6) encontrou um genótipo descrito por Jaeger e colaboradores (2018), de um isolado obtido de amostra de bovino da raça zebu por Santa Rosa e colaboradores (1980), identificado como uma estirpe Guaicurus, cepa de referência Bov. G, do sorogrupo Sejroe.

Tabela 6. Resultado da técnica VNTR para genotipagem de *L. santarosai*.

Isolado	Número de repetições			Genótipo
	VNTR S1	VNTR S2	VNTR S9	
Unesp03	3	15	18	Jaeger et al., 2018

Apesar de a técnica de VNTR não ser indicada para determinar sorovares/sorogrupos, é de extrema importância para a genotipagem de novas estirpes de *Leptospira* (Jaeger et al., 2018). Essa técnica já provou ser um adequado método discriminante para estudar a estrutura populacional de bactérias, com potencial de caracterizar isolados (Farlow et al., 2002).

Sequenciamento nucleotídico e inferências filogenéticas

O sequenciamento nucleotídico do gene *rrs* permitiu a identificação da espécie dos isolados (Tabela 7). As amostras Unesp01, Unesp02 e Unesp04 e Unesp05 apresentaram a sequência do gene *rrs* idêntica entre si (Figura 2) e demonstraram 100% de similaridade com a sequência de *L. interrogans*, descrita por Llanes e colaboradores em 2016 (nº de acesso: CP013147). Já a amostra Unesp03 apresentou 99% de identidade com a sequência de *L. santarosai* descrita por Chou e colaboradores em 2012 (nº de acesso: CP006694) (Tabela 7) e 15 polimorfismos em relação às outras sequências, caracterizando a espécie *L. santarosai* (Figura 2).

Tabela 7. Resultado da análise do gene *rrs* das amostras Unesp.

Isolado	Espécie	similaridade com outras sequências (nº de acesso GenBank)	Referência
Unesp01	<i>L. interrogans</i>	100% (CP013147)	Llanes et al., 2016
Unesp02	<i>L. interrogans</i>	100% (CP013147)	Llanes et al., 2016
Unesp03	<i>L. santarosai</i>	99% (CP006694)	Chou et al., 2012
Unesp04	<i>L. interrogans</i>	100% (CP013147)	Llanes et al., 2016
Unesp05	<i>L. interrogans</i>	100% (CP013147)	Llanes et al., 2016

Figura 2. Sequenciamento nucleotídico do gene *rrs* (16S rRNA) dos isolados Unesp01, Unesp02, Unesp03, Unesp04 e Unesp05.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Unesp01	ATGCAAGTCAAGCGGAGTAGCAATACTCAGCGGCGAAGCGGTGAGTAACACGTGGGTAACTCTCCTCTGAGTCTGGGATAACTTTCCGAA								
Unesp02									
Unesp03									
Unesp04									
Unesp05									
	100	110	120	130	140	150	160	170	180
Unesp01	AGGGAAGCTAACTACTGGATGGTCCCGAGAGATCATAAGATTTTTCGGGTAAAGATTTATGCTCGGAGATGAGCCCCGCTCCGATTAGCT								
Unesp02									
Unesp03									
Unesp04									
Unesp05									
	190	200	210	220	230	240	250	260	270
Unesp01	AGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTTCGGCCCAATGGAACGAGACACGGTCCATAC								
Unesp02									
Unesp03									
Unesp04									
Unesp05									
	280	290	300	310	320	330	340	350	360
Unesp01	TCCTACGGGAGGCGACAGTTAAGAACTCTTGCTCAATGGGGGGAACCTGAAGCAGCGACCGCGGTGAACGATGAAGGTCTTCGGATTGT								
Unesp02									
Unesp03									
Unesp04									
Unesp05									
	370	380	390	400	410	420	430	440	450
Unesp01	AAAGTTTCAGTAAGCAGGGAAAAATAAGCAGCAATGTGATGATGGTACCTGCGCTAAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCGCGGTAA								
Unesp02									
Unesp03									
Unesp04									
Unesp05									
	460	470	480	490	500	510	520	530	540
Unesp01	TACGTATGGTGCAAGCGTTGTTTCGGAACTCATTTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGACATGTAAGTCAGGTGTGAAACTCGGGGCTCAAC								
Unesp02									
Unesp03									
Unesp04									
Unesp05									
	550	560	570	580	590	600	610	620	630
Unesp01	TCGCACGCTGCACCTGAAACTATGTGCTCGGAGTTTGGGAGAGGCAAGTGGAAATCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCTGGAG								
Unesp02									
Unesp03									
Unesp04									
Unesp05									
	640	650	660	670	680	690	700	710	720
Unesp01	GAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTGCTGGCCTAAAACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGTAGTGAAACGGGATTAGATACCCCGGTAA								
Unesp02									
Unesp03									
Unesp04									
Unesp05									
	730	740	750	760	770	780	790	800	810
Unesp01	TCCACGCCCTAAACGTTGTCTACCACTGTTGGGGGTTTAAACCTCAGTAACGAACCTAACGGATTAAAGTAGACCGCCTGGGGACTATG								
Unesp02									
Unesp03									
Unesp04									
Unesp05									
	820	830	840	850	860	870	880	890	900
Unesp01	CTCGCAAGAGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGTCCGCACAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGATACGCGAAAAACCTCAC								
Unesp02									
Unesp03									
Unesp04									
Unesp05									
	910	920	930	940	950	960	970	980	990
Unesp01	CTAGGCTTGACATGGAGTGAATCATGTAGAGATACATGAGCCTTCGGGCGCTTCACAGGTGCTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTG								
Unesp02									
Unesp03									
Unesp04									
Unesp05									
	1000	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080
Unesp01	TGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGAACGAGCGCAACCCTCACCTTATGTTGCCATCATTTCAGTTGGGCACTCGTAAGGAACGCGGTGAC								
Unesp02									
Unesp03									
Unesp04									
Unesp05									
	1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170
Unesp01	AAACCGGAGGAAGCGGGGATGACGTCAAAATCCCTCAATGGGCTTTATGTCTAGGGCAACACACGTGCTCAATGCCCCGTACAAGGGTAG								
Unesp02									
Unesp03									
Unesp04									
Unesp05									
	1180	1190							
Unesp01	CCAACTCGCGAGGGGGAGCTAATCTCAA								
Unesp02									
Unesp03									
Unesp04									
Unesp05									

O sequenciamento nucleotídico do gene *secY* permitiu a confirmação da espécie em todas as amostras (Tabela 8). As amostras Unesp01, Unesp02, Unesp04 e Unesp05 apresentaram a sequência do gene *secY* idêntica entre si (Figura 3) e demonstraram 100% de similaridade com a sequência de *L. interrogans* descrita por Victoria e colaboradores (2008) (nº de acesso: EU358000). A amostra Unesp03 apresentou 99% de identidade com a sequência de *L. santarosai* também descrita por Victoria e colaboradores (2008) (nº de acesso: EU357994) (Tabela 8) e 91 polimorfismos em relação às outras sequências, caracterizando a espécie *L. santarosai* (Figura 3).

Tabela 8. Resultado da análise do gene *secY* do isolados Unesp.

Isolado	Espécie	% similaridade com outras sequencias (nº de acesso GenBank)	Referência
Unesp01	<i>L. interrogans</i>	100% (EU358000)	Victoria et al., 2008
Unesp02	<i>L. interrogans</i>	100% (EU358000)	Victoria et al., 2008
Unesp03	<i>L. santarosai</i>	99% (EU357994)	Victoria et al., 2008
Unesp04	<i>L. interrogans</i>	100% (EU358000)	Victoria et al., 2008
Unesp05	<i>L. interrogans</i>	100% (EU358000)	Victoria et al., 2008

Figura 3. Sequenciamento nucleotídico do gene *secY* dos isolados Unesp01, Unesp02, Unesp03, Unesp04 e Unesp05.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
UNESP01	TTT	TGCTTCG	TCTTTG	ATTTTAT	TCCTCAG	ACGATTAT	TCAATGG	TATCTA	ATAGTAGT
Unesp02	TTT	TGCTTCG	TCTTTG	ATTTTAT	TCCTCAG	ACGATTAT	TCAATGG	TATCTA	ATAGTAGT
Unesp03	T	C	CC	G	C	A	C	G	TCC
Unesp04	T	C	CC	G	C	A	C	G	TCC
Unesp05	T	C	CC	G	C	A	C	G	TCC
	100	110	120	130	140	150	160	170	180
UNESP01	GGAT	TTTTT	TAATCC	ATTCT	CTCAG	ATTGG	TATCAT	GCCTT	ATTTT
Unesp02	GGAT	TTTTT	TAATCC	ATTCT	CTCAG	ATTGG	TATCAT	GCCTT	ATTTT
Unesp03	C	C	G	C	C	C	A	G	C
Unesp04	C	C	G	C	C	C	A	G	C
Unesp05	C	C	G	C	C	C	A	G	C
	190	200	210	220	230	240	250	260	270
UNESP01	TTAT	ACAGCG	ATTAG	TTTAA	TCTGC	AGAATT	GGCTG	AGAATT	TGAAAA
Unesp02	TTAT	ACAGCG	ATTAG	TTTAA	TCTGC	AGAATT	GGCTG	AGAATT	TGAAAA
Unesp03	C	T	C	C	G	G	T	C	A
Unesp04	C	T	C	C	G	G	T	C	A
Unesp05	C	T	C	C	G	G	T	C	A
	280	290	300	310	320	330	340	350	360
UNESP01	CACAAA	GAATAC	ATTGAAA	AGTGT	TAAAT	AGAAT	CACTCT	TCCCG	GAGCTAT
Unesp02	CACAAA	GAATAC	ATTGAAA	AGTGT	TAAAT	AGAAT	CACTCT	TCCCG	GAGCTAT
Unesp03	C	G	C	A	C	G	C	C	G
Unesp04	C	G	C	A	C	G	C	C	G
Unesp05	C	G	C	A	C	G	C	C	G
	370	380	390	400	410	420	430	440	450
UNESP01	TATA	AAATTC	TTAGAT	TTGAG	CTCTA	ACTCC	GCGGT	GGAAT	CTTTG
Unesp02	TATA	AAATTC	TTAGAT	TTGAG	CTCTA	ACTCC	GCGGT	GGAAT	CTTTG
Unesp03	C	T	C	C	A	C	G	T	G
Unesp04	C	T	C	C	A	C	G	T	G
Unesp05	C	T	C	C	A	C	G	T	G
	460	470	480	490	500	510	520		
UNESP01	TGCA	CTCG	AGACTT	TAAAC	AAATG	AGTCT	CAACTT	TAAAT	GAGAA
Unesp02	TGCA	CTCG	AGACTT	TAAAC	AAATG	AGTCT	CAACTT	TAAAT	GAGAA
Unesp03	G	G	C	G	C	C			
Unesp04	G	G	C	G	C	C			
Unesp05	G	G	C	G	C	C			

As árvores filogenéticas obtidas foram congruentes na sua topologia geral e apresentam que todos os clados foram suportados por altos valores de probabilidade posterior (PP) ($\geq 50\%$) (Tabela 9).

Tabela 9. Matrices e dados estatísticos dos alinhamentos inferidos pela análise Bayesiana (BI)

Matriz	Terminais	Caracteres consideradas gaps	Clados com suporte > 50%
		Bp	n(%)
Rrs	120	1.451	53 (53)
SecY	98	1.245	64 (64)
Concatenada	61	2.585	38 (38)

Na análise do gene *rrs* foi usado um número de sequências maior do que no estudo de Morey et al. (2006), obtendo resultados similares, já que na árvore resultante foram destacadas as espécies de *Leptospira* saprófitas, intermediárias e patogênicas. Azócar-Aedo e colaboradores (2014) classificaram as 23 espécies do gênero *Leptospira* com base em análises filogenéticas dos genes 16S rRNA e os reuniram em três grupos, denominados patogênicas, intermediárias e saprófitas. As espécies isoladas no presente trabalho, *Leptospira interrogans* e *L. santarosai* fazem parte do grupo das patogênicas

Assim, as amostras Unesp01, Unesp02, Unesp04 e Unesp05 foram agrupadas no clado de *Leptospira interrogans*, e a Unesp03, por sua vez, no clado da *Leptospira santarosai*, com valores de PP altos. Além disso, foi possível diferenciar as subdivisões da leptospira quanto a sua patogenicidade.

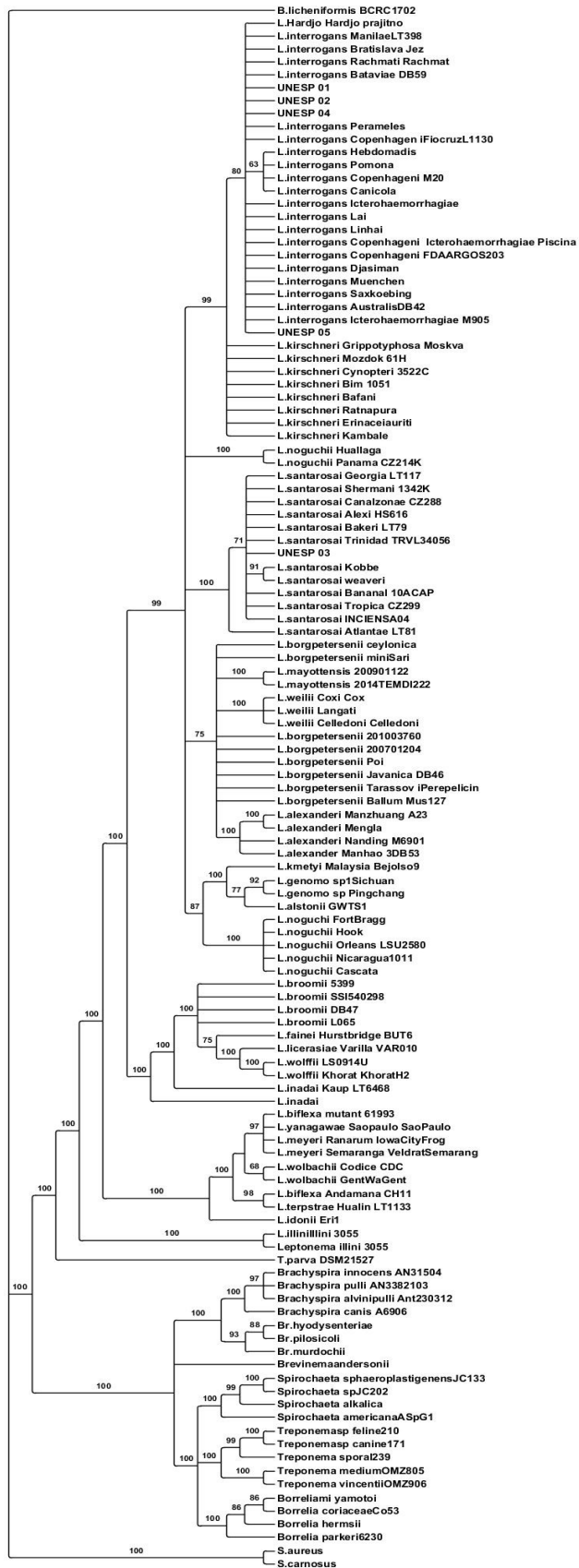
Nesta avaliação, as sequências de *Leptospira interrogans* foram subdivididas em 2 subclados, em que Unesp01, Unesp02, Unesp04 e Unesp05 estão junto com os sorovares Australis, Bataviae, Bratislava, Copenhageni, Copenhageni/Icterohaemorrhagiae, Djasiman, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Lai, Linhai, Manilae, Muenchen, Perameles, Rachmati e Sakoebing (Figura 4). Os isolados Unesp01 e Unesp05, identificados pelas técnicas de sorogrupagem e VNTR (Tabela 5) como pertencentes ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae, sorovares Copenhageni/Icterohaemorrhagiae, ficaram agrupados no clado junto com a maior parte das amostras do mesmo sorogrupo. O sorovar Copenhageni esteve presente nos 2 subclados da espécie *L. interrogans*, sendo observado que no clado em que ficaram agrupados os isolados Unesp as sequências eram de amostras obtidas no Brasil e nos Estados Unidos, ao passo que o sorovar Copenhageni M-20 foi sequenciado de uma amostra obtida na Dinamarca isolada em 1938 (Miraglia et al., 2013).

Apesar de pertencerem ao mesmo sorovar, a diferença geográfica e a de tempo podem acarretar variações no perfil da bactéria, tendo em vista que podem ocorrer mudanças nos sorovares com o decorrer dos anos (Vedhagiri et al., 2009). O resultado foi coerente, pois demonstrou que os isolados do mesmo continente compartilham um ancestral comum mais recente. Os isolados Unesp02 e Unesp04 foram identificados como do sorogrupo Autumnalis pela sorogrupagem, agrupados junto ao sorovar Rachmati, do mesmo sorogrupo (Cerqueira et al., 2010), ambos da

espécie *L. interrogans*. Já o Unesp03 ficou em um clado distinto, sendo identificado como da espécie *L. santarosai*, no mesmo clado do sorovar Bananal, amostra sequenciada por Moreno et al. (2016) de isolado do Estado de São Paulo.

Outras bactérias da Ordem *Spirochaetales*, família *Spirochaetaceae*, com as sequências disponíveis foram adicionados à análise, formando o grupo externo ou outgroup, para dar enraizamento à árvore e atestar que as espiroquetas isoladas eram do gênero *Leptopospira* (Figura 4). De acordo com Page e Holmes (1998) o outgroup tem a função de dar à árvore uma polaridade evolutiva, mostrando quais são as sequências mais ancestrais.

Figura 4. Árvore desenvolvida com base na Inferência Bayesiana do gene *rrs*. Os valores dos ramos mostram a probabilidade posterior (PP).

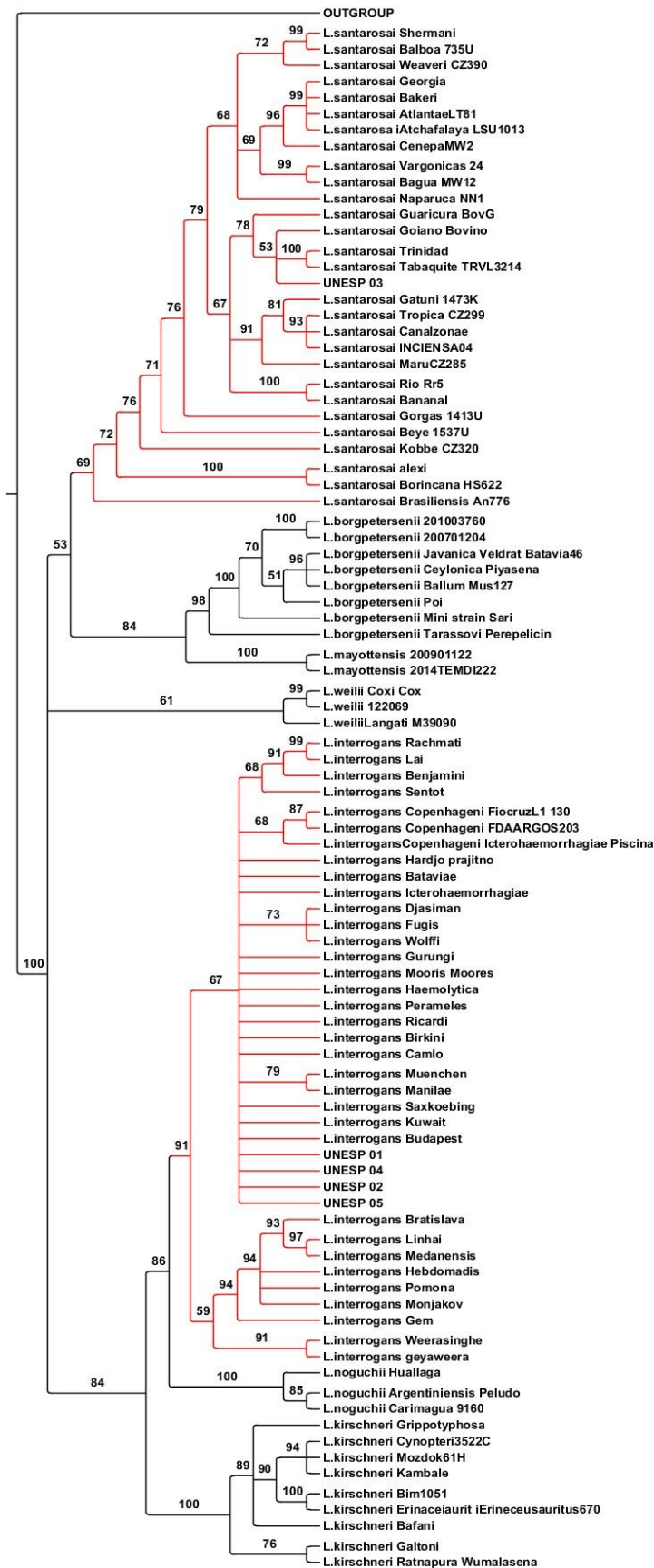


Apesar de a avaliação da árvore filogenética das sequências com base no gene-
alvo *rrs* ter sido capaz de caracterizar as genoespécies, *Leptospira interrogans* e *L.*
santarosai, e ter sido capaz de formar clados que agruparam os isolados juntos a
outros da mesma espécie, sorogrupo e região, é apropriada a avaliação de outros
genes, como o *secY* (Hamond et al., 2012).

Na inferência obtida com o gene *secY*, foram confirmados os resultados
obtidos pela análise do gene *rrs* nas amostras Unesp (Figura 5). Além disso,
observar que todas as espécies formaram clados monofiléticos, ou seja, o clado
inclui todas as espécies derivadas de um único ancestral, além de propiciar maior
resolução dos clados de cada espécie.

Por sua vez, a amostra Unesp03 ficou no clado com os sorovares/estirpes de
Leptospira santarosai Guaicurus, Goiano, Trinidad e Tabaque, e pela técnica de
VNTR o isolado Unesp03 se apresentou com o mesmo genótipo do Guaicurus
(Tabela 6), demonstrando a proximidade genética entre eles. A estirpe Unesp03 e
Goiano foram isolados no mesmo estado, São Paulo, e apesar de terem origem em
espécies diferentes, suíno e bovino, respectivamente, ambos não demonstrava
sinais clínicos da doença no momento do isolamento (Santa Rosa et al., 1980),
apresentando-se a infecção de forma silenciosa, dado que pode ser uma
característica destas leptospiros. Além disso, o Unesp03 é do sorogrupo Sejroe,
esse sorogrupo contempla os principais sorovares responsáveis por causar a
leptospirose em todo mundo, com especial importância em ruminantes (Loureiro et
al., 2016) e assim como o sorogrupo Hebdomadis é encontrado entre os mais
prevalentes em rebanhos bovinos (Paixão et al., 2016).

Figura 5. Árvore desenvolvida com base na inferência Bayesiana do gene *secY*. Os valores dos ramos mostram a probabilidade posterior (PP).



A utilização dos genes *rrs* e *secY* tem funções complementares. Enquanto o *rrs* é empregado em técnicas de PCR com a função de identificar a espécie do estudo, escolhido por ser um gene obrigatoriamente presente em todas as bactérias (Millar et al., 2007), o *secY* tem potencial de auxiliar em análises taxonômicas da *Leptospira* spp. (Victoria et al., 2008), em especial das leptospirosas patogênicas (Ferreira et al., 2014). No entanto, alguns estudos utilizam apenas um dos genes como alvo.

As leptospirosas selecionadas foram avaliadas quanto à presença dos genes 16S, *secY* e 16S e *secY* concatenados (continham sequências dos dois genes, *rrs* e *secY* disponíveis) (Tabela 1). Com a disponibilidade das sequências provenientes dos dois genes, foi possível alinhar os dados e construir uma nova árvore, mais consistente. A matriz formada foi submetida ao método de inferência bayesiana. Este método de inferência filogenética realiza uma análise simultânea de todos os sítios concatenados para a reconstrução da árvore (Queiroz e Gatesy, 2007).

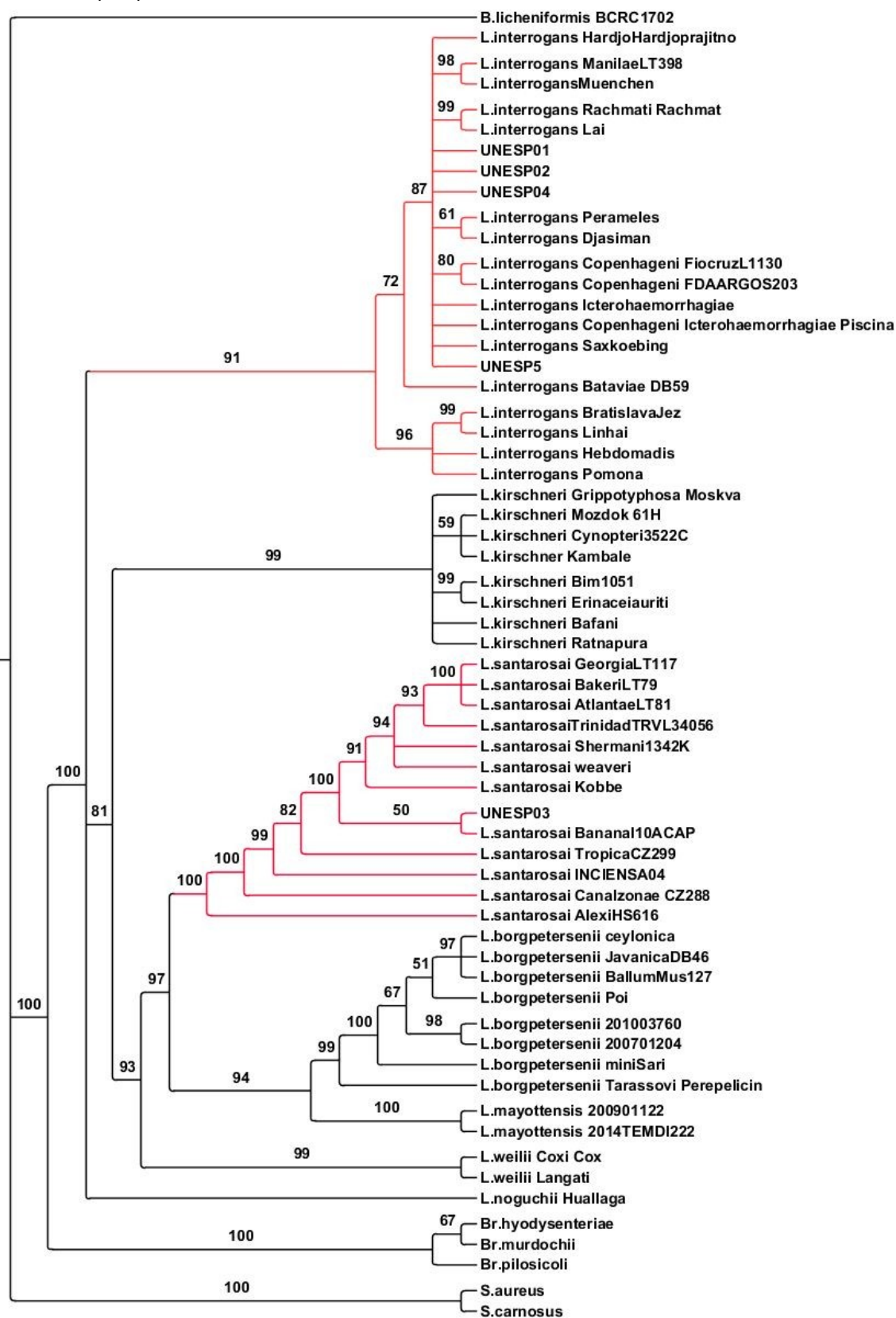
A análise de evidência total, com os genes concatenados (Figura 6), confirmou os resultados obtidos pelas duas inferências dos genes e melhorou a resolução e os valores de probabilidade posterior dos clados. As amostras Unesp01, Unesp02, Unesp04 e Unesp05 continuaram no clado da *L. interrogans*, junto aos sorovares Copenhageni, Copenhageni/Icterohaemorrhagiae, Djasiman, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Lai, Manilae, Muenchen, Perameles, Rachmati e Sakoebing, semelhante à árvore formada pelas sequências do gene 16S (Figura 4), no entanto, com um aumento no valor da PP, dando mais consistência às informações.

O Unesp03 ficou no clado da *Leptospira santarosai*, em um subclado com a *Leptospira santarosai* Bananal, leptospira isolada de uma capivara no Estado de São Paulo. A granja de origem do suíno do qual foi obtido o Unesp03 também se localizava no Estado de São Paulo, com área de fronteira com uma reserva ambiental com presença de um curso d'água e animais selvagens, ambiente com características de fauna e flora semelhantes ao de origem da capivara que deu origem ao Bananal (Marvulo et al., 2002).

Como há poucas informações disponíveis sobre a diversidade genética das espécies e dos sorovares encontrados em suínos, é importante identificar o agente causador da leptospirose nesta espécie animal. Com o êxito no isolamento de cinco

amostras dos sorogrupos Autumnalis, Icterohaemorrhagiae e Sejroe, de diferentes regiões, é importante tentar obter mais informações e formular hipóteses quanto ao processo evolutivo das leptospiros isoladas. Tendo em vista que as sequências de DNA não são só registros de relações filogenéticas e tempos de divergência, mas também guardam marcas de como ocorreu o processo evolucionário (Page e Holmes, 1998), é necessário utilizar ferramentas que extraiam mais informações para tentar interpretar os dados fornecidos, com a utilização de técnicas de biologia molecular, como PCR, sequenciamento e VNTR, que são sensíveis, específicas e capazes de detectar e analisar as informações presentes no genoma dos patógenos (Robertis e Hib, 2006).

Figura 6. Árvore desenvolvida com base na inferência Bayesiana dos genes concatenados. Os valores dos ramos mostram a probabilidade posterior (PP).



Conclusões

Com os dados do sequenciamento nucleotídico e dos três modelos evolutivos, foram feitas as inferências filogenéticas. Nos três modelos, os isolados Unesp ficaram agrupados nos clados da *L. interrogans* (Unesp01, Unesp02, Unesp04 e Unesp05) e *L. santarosai* (Unesp03), sempre agrupados com outras leptospiros da mesma espécie, sorogrupo e região do isolamento, o que demonstra que esses fatores influenciam o genoma das leptospiros e demonstra a importância de conhecer o agente etiológico que ocorre em cada região, com a finalidade de entender a distribuição dos diferentes sorogrupos/sorovares, principais hospedeiros e com essas informações desenvolver planos de ação mais efetivos voltados ao controle e à prevenção da leptospirose.

Referências

- Acha PN, Szyfres B (2003) Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a los Animales: Bacteriosis y Micosis. **Publicación Científica nº 580** 1(3): 175-185.
- Ahmed N, Devi SM, Valverde MdeL, Vijayachari P, Machang'u RS, Ellis WA, Hartskeerl RA (2006) Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials** 5: 28(1-10).
- Akaike H (1973) Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. In: Petrov BN, Csaki F. **Second International Symposium on Information Theory**. Budapest: Akademiai Kiado, 1: 267-281.
- Alonso BR, Haz HJG, Paz RC (2000) Leptospirosis humana: um problema de salud?. **Revista Cubana de Salud Pública** 26: 27-34.
- 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.

Bhullar K, Waglechner N, Pawlowski A, Koteva K, Banks ED (2012) Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. **PLoS ONE** 7(4): e34953.

Brocchieri L (2001) Phylogenetic inferences from molecular sequences: Review and critique. **Theoretical Population Biology**. 59(1): 27-40.

Burnham KP, Anderson DR, Huyvaert KP (2010) AIC model selection and multimodel inference in behavioral ecology: some background, observations, and comparisons. **Behavioral Ecology and Sociobiology** 65: 23-35

Cerqueira GM, McBride AJ, Hartskeerl RA, Ahmed N, Dellagostin OA, Eslabao MR, Nascimento AL (2010). Bioinformatics describes novel loci for high resolution discrimination of *Leptospira* isolates. **PLoS ONE** 5(10): e15335.

Chiareli D, Cosate MRV, Moreira EC, Leite RC, Lobato FCF, Silva JA, Teixeira JFB, Marcelino AP (2012) Controle da leptospirose em bovinos de leite com vacina autógena em Santo Antônio do Monte, Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 32(7): 633-639.

Chou LF, Chen YT, Lu CW, Ko YC, Tang CY, Pan MJ, Tian YC, Chiu CH, Hung CC, Yang CW (2012) Sequence of *Leptospira santarosai* serovar Shermani genome and prediction of virulence-associated genes. **Gene** 511(2): 364-70.

Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods** 9: 772–772.

Durski KN, Jancloes M, Chowdhary T, Bertherat E (2014) A global, multi-disciplinary, multi-sectorial initiative to combat leptospirosis: Global Leptospirosis Environmental Action Network (GLEAN). **International Journal of Environmental Research and Public Health** 11(6): 6000-6008.

Ellis WA, Neill SD, Brien JJO, Cassells JA, Hanna J (1982) Bovine leptospirosis: Microbiological and serological findings in normal fetuses removed from the uteri after slaughter. **Veterinary Record** 110: 192–194.

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

Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P (1999) ***Leptospira* and Leptospirosis**. 2nd Edition, Medisci Press, Melbourne: Australia, 295 p.

Farlow J, Postic D, Smith KL, Jay Z, Baranton G, Keim P (2002) Strain typing of *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia afzelii*, and *Borrelia garinii* by using multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. **Journal of Clinical Microbiology** 40(12): 4612-4618.

Felsenstein J (1978) Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. **Systematic Zoology** 27(4): 401-410.

Fenner JS, Anjum MF, Randall LP, Pritchard GC, Wu G, Errington J, Dalley CG, Woodward MJ (2010) Analysis of 16S rDNA sequences from pathogenic *Leptospira* serovars and use of single nucleotide polymorphisms for rapid speciation by D-HPLC. **Research in Veterinary Science** 89(1): 48-57.

Ferreira AS, Costa P, Rocha T, Amaro A, Vieira ML, Ahmed A, Thompson G, Hartskeerl RA, Inácio J (2014) Direct detection and differentiation of pathogenic *Leptospira* species using a multi-gene targeted real time PCR approach. **PLOS one** 9 (11): e112312.

Freitas JC, Silva FG, Oliveira RC, Delbem ACB, Müller EE, Alves LA, Teles OS (2004) Isolation of *Leptospira* spp from dogs, bovine and swine naturally infected. **Ciência Rural** 34: 853-856.

Hall TA (1999) BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series** 41: 95-98.

Hamond C, Martins G, Lilenbaum W (2012) Subclinical leptospirosis may impair athletic performance in racing horses. **Tropical Animal Health and Production** 44 (8): 1927-1930.

Hamond C, Pinna M, Medeiros MA, Bourhy P, Lilenbaum W, Picardeau M (2015) A multilocus variable number tandem repeat analysis assay provides high discrimination for genotyping *Leptospira santarosai* strains. **Journal of Medical Microbiology** 64(5): 507-12.

Hasegawa M, Kishino H, Yano TA (1985) Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. **Journal of molecular evolution** 22(2): 160-174.

Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics** 17: 754–755.

Hussaini SN, Ruby KR (1976) Comparative studies on the use of 5-fluorouracil in two different media as a selective agent for isolation of leptospira. **Research in Veterinary Science** 20:148-150.

Izurieta R, Galwankar S, Clem A (2008) Leptospirosis: The "mysterious" mimic. **Journal of Emergencies, Trauma, and Shock** 1: 21-33.

Jaeger LH, Loureiro AP, Lilenbaum W (2018) VNTR analysis demonstrates new patterns and high genetic diversity of *Leptospira* sp. of animal origin in Brazil. **Letters in Applied Microbiology** 67(2): 183-189

Katoh K, Misawa K, Kuma KI, Miyata T (2002) MAFFT: A novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. **Nucleic Acids Research** 30: 3059–3066.

Killinger AH, Taylor PL, Huhn RG, Hanson LE, Mansfield ME (1976) Immunity to leptospirosis: Renal changes in vaccinated cattle given challenge inoculum. **American Journal of Veterinary Research** 27(1): 93-94.

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

Llanes A, Restrepo CM, Rajeev S (2016) Whole genome sequencing allows better understanding of the evolutionary history of *Leptospira interrogans* Serovar Hardjo. **PLoS One** 11(7): e0159387.

Loureiro AP, Hamond C, Pinto P, Bremont S, Bourhy P, Lilenbaum W (2016) Molecular analysis of leptospires from serogroup Sejroe obtained from asymptomatic cattle in Rio de Janeiro - Brazil reveals genetic proximity to serovar Guaricura. **Research in Veterinary Science** 105: 249-53.

Majed Z, Bellenger E, Postic D, Pourcel C, Baranton G, Picardeau M (2005) Identification of variable-number tandem-repeat loci in *Leptospira interrogans* sensu stricto. **Journal of Clinical Microbiology** 43(2): 539-45.

Marchiori Filho M, Girio RJS, Lui JF, Mathias LA (2002) Estudo sorológico para leptospirose em populações de javalis (*Sus scrofa scrofa* Linnaeus, 1758) dos Estados de São Paulo e Paraná. **Arquivos do Instituto Biológico** 69(3): 9-15.

Marvulo MFV, Paula CD, Ferreira PM, Morais ZM, Delbem ACB, Fávero ACM, Miraglia F, Castro V, Genovez ME, Ferraz K, Verdade LM, Fellipe PAN, Ferraz E, Penteado M, Ferreira Neto JS, Ferreira F, Vasconcellos SA (2002) Detection of *Leptospira* in two free living populations of capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) from São Paulo state, Brazil. **Resumos** Bridgetown: International Leptospirosis Society s/p.

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

Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T (2010) **Creating the CIPRES science gateway for inference of large phylogenetic trees**. In: Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE). New Orleans, Louisiana, USA 797p.

Miraglia F, Matsuo M, Morais ZM, Dellagostin OA, Seixas FK, Freitas JC, Hartskeerl R, Moreno LZ, Costa BL, Souza GO, Vasconcellos SA, Moreno AM (2013) Molecular characterization, serotyping, and antibiotic susceptibility profile of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni isolates from Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** 77(3): 195–199.

Miraglia F, Moraes ZM, Melville PA, Dias RA, Vasconcellos SA (2009) EMJH medium with 5-fluorouracil and nalidixic acid associated with serial dilution technique used to recover *Leptospira* spp from experimentally contaminated bovine semen. **Brazilian Journal of Microbiology** 40: 189-193.

Moreno LZ, Miraglia F, Lilenbaum W, Neto JSF, Freitas JC, Morais ZM, Hartskeerl RA, Costa BLP, Vasconcellos SA, Moreno AM (2016) Profiling of *Leptospira interrogans*, *L. santarosai*, *L. meyeri* and *L. borgpetersenii* by SE-AFLP, PFGE and susceptibility testing a continuous attempt at species and serovar differentiation. **Emerging Microbes and Infections** 5: e17

Morey RE, Galloway RL, Bragg SL, Steigerwalt AG, Mayer LW, Levett PN (2006) Species-specific identification of Leptospiraceae by 16S rRNA gene sequencing. **Journal of Clinical Microbiology** 44(10): 3510-3516.

Page RDM, Holmes EC (1998) **Molecular evolution: A Phylogenetic Approach**. Oxford: Blackwell Science Ltd., 352p

Paixão AP, Santos HP, Alves LMC, Pereira HM, Carvalho RFB, Costa Filho VM, Oliveira EAA, Soares DM, Beserra PA (2016) *Leptospira* spp. em bovinos leiteiros do estado do Maranhão, Brasil: frequência, fatores de risco e mapeamento de rebanhos reagentes. **Arquivos do Instituto Biológico** 83: e1022014.

Picardeau M, Bertherat E, Jancloes M, Skouloudis AN, Durski K, Hartskeerl RA (2014) Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: Current tools and emerging technologies. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** 78: 1-8.

Pinto PS, Pestana C, Medeiros MA, Walter Lilenbaum W (2017) Plurality of *Leptospira* strains on slaughtered animals suggest a broader concept of adaptability of leptospires to cattle. **Acta Tropica** 172: 156–159.

Queiroz A, Gatesy J (2007) The supermatrix approach to systematics. **Trends in Ecology & Evolution** 22(1): 34-41.

Rambaut A (2009) FigTree (v1.3.1). Tree figure drawing tool. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/> Acesso:14 jul. 2018.

Robertis EMF, Hib J (2006) **Bases da biologia celular e molecular**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 389p.

Russell WMS, Burch RL (1959) (Reimpressão 1992). **The principles of humane experimental technique**. Wheathampstead (UK): Universities Federation for Animal Welfare.

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.

Sanchez RGP, Lopez JA, Pereira MM, Naranjo MA, Agudelo-Flórez P (2016) Genetic diversity of *Leptospira* in northwestern Colombia: First report of *Leptospira santarosai* as a recognised leptospirosis agent. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 111(12): 737-744.

Santa Rosa CA, Sulzer CR, Pestana de Castro AF, Yanaguita RM, Giorgi W (1980) Two new leptospiral serovars in the Hebdomadis group isolated from cattle in Brasil. **The International Journal of Zoonoses** 7: 158-163.

Schneider MC, Jancloes M, Buss DF, Aldighieri S, Bertherat E, Najera P, Galan DI, Durski K, Espinal MA (2013) Leptospirosis: A silent epidemic disease. **International Journal of Environmental Research and Public Health** 10(12): 7229–7234.

Shimabukuro FH, Domingues PF, Langoni H, Silva AV, Pinheiro JP, Padovani CR (2003) Pesquisa de suínos portadores renais de leptospiros 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** 40: 243-253.

Soto FRM, Vasconcellos SA, Pinheiro SR, Bernardi 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.

Stöver BC, Muller KF (2010) TreeGraph 2: combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. **BMC Bioinformatics** 11: 7.

Terpstra WJ, Korver H, Leewen J, Van Klatser PK, Kolk AHJ (1985) The classification of Sejroe group serovars of *Leptospira interrogans* with monoclonal antibodies. **Zentralblatt Fur Bakteriologie Und Hygiene** 259: 498–506.

Thiermann AB (1984) Isolation of leptospires in diagnosis of leptospirosis. **Modern veterinary practice** 5(10): 758- 759.

Thrusfield, MV (2005) **Veterinary epidemiology**. 3. ed. Ames: Blackwell Publishing Professional 610 p.

Vedhagiri K, Natarajaseenivasan K, Chellapandi P, Prabhakaran SG, Joseph S, Sharma S, Vijayachari P (2009) Evolutionary implication of outer membrane lipoprotein-encoding genes ompL1, lipL32 and lipL41 of pathogenic *Leptospira* species. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics** 7(1.3): 96-106.

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** 16;3(7): e2752.

Wasiński B (2014) 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** 58: 521-526.

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology** 173(2): 697-703.

Wiens JJ (2006) Missing data and the design of phylogenetic analyses. **Journal of Biomedical Informatics** 39: 34-42.

Yang C-W, Wu M-S, Pan M-J, Hsieh WJ, Vandewalle A, Huang C-C (2002) The *Leptospira* outer membrane protein LipL32 induces tubulointerstitial nephritis-mediated gene expression in mouse proximal tubule cells. **Journal of the American Society of Nephrology** 13(8): 2037–2045.

CAPÍTULO 6 - Caracterização soroepidemiológica empregando estirpes autóctones na técnica de soroaglutinação microscópica aplicada ao diagnóstico da leptospirose em suínos abatidos no Estado de São Paulo

Resumo - A leptospirose, apesar de negligenciada, é uma das mais importantes bacterioses no mundo, especialmente em países tropicais como o Brasil, por se tratar de uma zoonose que causa problemas econômicos e risco para a saúde pública. Na suinocultura, é responsável por perda de animais jovens e abortamento em matrizes, com sinais clínicos que podem variar de ausente a severo, dependendo da fase do animal e do sorovar circulante na granja. O objetivo do trabalho foi comparar a capacidade de detecção de animais sororreagentes usando uma coleção de antígenos apenas com os sorovares de referência frente a essa coleção acrescida de estirpes de leptospiros autóctones isoladas no Brasil, com o intuito de identificar se a inclusão de isolados brasileiros aumentaria a sensibilidade do diagnóstico sorológico da leptospirose suína. Para isso, foi utilizada a técnica de soroaglutinação microscópica (MAT), empregando no total uma coleção de antígenos vivos com 38 antígenos, composto por 24 sorovares de referência e 14 estirpes autóctones isoladas de animais provenientes de várias regiões do Brasil, entre elas, cinco isolados de animais do presente estudo. A amostragem foi composta por 1.284 suínos adultos abatidos na mesorregião de Ribeirão Preto. Como resultado obtido, 417 (32,47%) foram reagentes na MAT a pelo menos um sorovar, quando utilizada uma coleção de 24 sorovares de referência. Já com uma coleção de 38 antígenos, composta pela coleção de referência e as estirpes autóctones, o número de reagentes subiu para 598 (46,57%), um acréscimo de 181 animais. Dentre as estirpes autóctones utilizadas, as que mais se destacaram foram: Unesp05, Unesp01, Unesp02, LO4, Unesp04. Em relação a todas as amostras reagentes, entre sorovares de referência e estirpes regionais, o sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* foi o mais presente no inquérito sorológico. Observou-se que a inclusão de estirpes autóctones isoladas no Brasil propiciou o aumento significativo do número de suínos identificados como positivos na MAT para diagnóstico de

leptospirose, especialmente quando as estirpes são de origem da mesma espécie animal e da mesma região do estudo.

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

Introdução

A leptospirose é uma zoonose que representa um grande problema econômico e de saúde pública e que tem especial importância no Brasil, país com clima e diversidade de espécies de hospedeiros que favorecem o desenvolvimento da bactéria. A doença é causada pela *Leptospira* spp., bactéria capaz de infectar mamíferos silvestres, domésticos, de produção e o homem, determinando quadros clínicos variados, que vão desde infecção subclínica a doença grave que, se não tratada, pode ser fatal. Animais infectados podem se tornar portadores renais, disseminando a doença no ambiente e permitindo a manutenção do ciclo epidemiológico desse patógeno (Faine et al., 1999). Com o decorrer dos anos, mudanças climáticas, ecológicas e o estreitamento das relações entre homens e animais propiciaram alterações no perfil epidemiológico da leptospirose, entre elas a mudança dos sorovares circulantes e os tipos de estirpes presentes (Naotunna et al., 2016).

Nos suínos a doença gera sinais moderados, sendo detectada com maior frequência em fêmeas gestantes, por causar perdas reprodutivas. Entretanto, a doença nessa espécie pode variar de silenciosa, sem sinais clínicos sugestíveis, até formas mais graves e letais, dependendo do sorovar infectante (Oliveira, 1999). Mas independentemente da forma clínica, para diferenciar a leptospirose de outras doenças que acometem os animais, com manifestações clínicas similares, testes confirmatórios são necessários.

Na leptospirose, o diagnóstico pode ocorrer de duas formas, direto, quando há possibilidade da coleta de material para cultura e tempo para obter a multiplicação necessária para identificação do isolado, e indireto por teste sorológico, principalmente em animais cujo ciclo de produção é rápido, não havendo

tempo hábil para aguardar o isolamento para iniciar o tratamento, e em muitas situações a associação dos métodos é indicada, coletando material para cultivo e para sorologia.

A base do diagnóstico sorológico de leptospirose é o teste de soroaglutinação microscópica com antígenos vivos (MAT), técnica amplamente utilizada em todo o mundo, e considerada o padrão-ouro (Levett, 2001). No entanto, para que o resultado do diagnóstico sorológico seja confiável, deve ser baseado em sorovares de referência e em estirpes regionais, obtidas por cultivo e isolamento a partir de animais da região, e sempre que uma estirpe for obtida deve ser incorporada à coleção de antígenos, em especial para a espécie da qual foi isolada (Naotunna et al., 2016). Dada a alta frequência de diversidade sorológica e genética da *Leptospira*, é importante identificar as espécies e os sorogrupos circulantes em uma dada região, a fim de melhorar as estratégias de controle e prevenção da doença (Sanchez et al., 2016).

Tendo em vista a importância econômica da suinocultura e o risco de perdas econômicas e para saúde pública no Brasil, o objetivo do presente trabalho foi comparar a capacidade de detecção de animais reagentes empregando uma coleção de antígenos apenas com os sorovares de referência frente a coleção de sorovares de referência com a inclusão de estirpes de leptospiros autóctones isoladas no Brasil.

Material e Métodos

Para este estudo foram coletadas 1.284 amostras de sangue de suínos adultos, clinicamente saudáveis, abatidos em três matadouros-frigorífico localizados na Mesorregião de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, no ano de 2016, provenientes de granjas dos estados de São Paulo, 651 amostras, Santa Catarina, 277 amostras, Paraná, 256 amostras, e Mato Grosso do Sul, 100 amostras.

As amostras de sangue foram coletadas no momento da sangria na linha de abate, em tubos descartáveis de coleta de sangue sem aditivo ou anticoagulante. Imediatamente após a coleta, o sangue foi mantido em temperatura ambiente até a

coagulação, posteriormente o soro foi transferido para microtubos e estocado a - 20°C até a realização dos testes sorológicos.

O trabalho foi aprovado (nº 12276/15) pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Câmpus de Jaboticabal/Unesp – SP, Brasil.

Técnica de soroaglutinação microscópica (MAT)

Para a realização do diagnóstico de leptospirose foi utilizada a técnica de soroaglutinação microscópica (MAT), de acordo com a metodologia descrita pela OIE (2014), empregando uma coleção de 38 antígenos vivos, sendo 24 sorovares de referência (Andamana, Australis, Bratislava, Autumnalis, Butembo, Castellonis, Bataviae, Canicola, Whitcombi, Cynopteri, Sentot, Grippotyphosa, Hebdomadis, Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Panama, Pomona, Pyrogenes, Hardjo, Wolffi, Patoc, Shermani, Tarassovi) e 14 estirpes autóctones isoladas de animais de várias regiões do Brasil (Tabela 1), entre elas, 5 isoladas dos animais do presente estudo (Unesp01, Unesp02, Unesp03, Unesp04 e Unesp05).

Tabela 1. Estirpes de leptospiros autóctones isoladas no Brasil, segundo sorovar, sorogrupo, espécie e animal de origem.

Estirpe	Sorovar	Sorogrupo	Especie	Animal
Guaicurus	Guaricura	Sejroe	<i>L. santarosai</i>	Búfalo
Goiano	Goiano	Hebdomadis	<i>L. interrogans</i>	Bovino
LO10	Copenhageni	Icterohaemorrhagiae	<i>L. interrogans</i>	Bovino
LO4	Canicola	Canicola	<i>L. interrogans</i>	Suíno
GR6	Pomona	Pomona	<i>L. interrogans</i>	Suíno
2A – CAP	Bananal	Grippotyphosa	<i>L. santarosai</i>	Capivara
BRA	Brasiliensis	Bataviae	<i>L. santarosai</i>	Gambá
110/06	-	Pomona	<i>L. kirschneri</i>	Cachorro do Mato
LO14	Canicola	Canicola	<i>L. interrogans</i>	Canino
Unesp01	Copenhageni/ Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	<i>L. interrogans</i>	Suíno
Unesp02	Autumnalis	Autumnalis	<i>L. interrogans</i>	Suíno
Unesp03	Hardjoprajitno, Hardjobovis, Wolffi	Sejroe	<i>L. santarosai</i>	Suíno
Unesp04	Autumnalis	Autumnalis	<i>L. interrogans</i>	Suíno
Unesp05	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni/ Icterohaemorrhagiae	<i>L. interrogans</i>	Suíno

Na etapa de triagem, foram consideradas reagentes as amostras que atingiram no mínimo 50% de aglutinação em microscopia de campo escuro, a partir da diluição de 1:100. Após a triagem, as amostras reagentes foram tituladas em razão dois. Foram consideradas positivas as amostras com títulos ≥ 100 .

Com a finalidade de comparação, os resultados do MAT foram avaliados de três formas, utilizando a coleção de antígenos de referência (24 sorovares); a coleção de referência em conjunto com 9 estirpes autóctones do Brasil obtidas de diferentes regiões e espécies, cedidas pelo Laboratório de Zoonoses Bacterianas do PVS/ USP São Paulo, totalizando 33 antígenos; e a coleção de referência acrescida de 14 estirpes autóctones, as 9 mencionadas anteriormente mais 5 isoladas de suínos do presente trabalho. Durante a coleta de sangue para realização dos testes sorológicos também foram coletadas amostras de rim e urina dos animais para cultivo e tentativa de isolamento. Ao final de trinta semanas, cinco isolados foram obtidos e agregados à coleção do Laboratório de Diagnóstico de Leptospirose e Brucelose da FCAV/ UNESP Jaboticabal, contabilizando 38 antígenos.

Para determinação do sorovar mais provável foi considerado o sorovar que apresentou maior título em cada amostra, sendo a amostra desconsiderada da análise quando o título mais alto foi idêntico contra dois ou mais sorovares (Vasconcellos et al., 1997).

Análise estatística

Foram calculadas as proporções de animais reagentes, assim como seus respectivos intervalos de confiança 95% (Thrusfield, 2005). Para verificar se houve mudança significativa no número de reagentes após o acréscimo de sorovares à bateria, utilizou-se o teste de McNemar, cujos cálculos foram efetuados por meio do software R. Para esta última finalidade, calculou-se também o intervalo de confiança da diferença de proporções para amostras relacionadas (Altman, 1999).

Resultados

Dos 1.284 suínos adultos abatidos na mesorregião de Ribeirão Preto, 417 (32,5%) foram reagentes na MAT a pelo menos um sorovar, quando utilizada a coleção de 24 sorovares de referência. Com a coleção de 33 antígenos, composta pelos sorovares de referência e quatorze estirpes autóctones, houve 439 (34,2%) reagentes, e já com uma coleção de 38 antígenos, composta pelos antígenos

anteriores e as cinco estirpes obtidas dos animais do presente trabalho, o número de reagentes subiu para 598 (46,6%) (tabela 2).

Tabela 2. Número de suínos examinados e reagentes no teste de soroaglutinação microscópica para diagnóstico de leptospirose, com a proporção de reagentes e seu respectivo intervalo de confiança, de acordo com a Unidade da Federação de origem das amostras e a coleção de antígenos utilizada. Brasil, 2016.

UF	Amostras	Coleção 24 antígenos de referência			Coleção 33 antígenos (24 de referência e 9 autóctones)			Coleção 38 antígenos (24 de referência e 14 autóctones)		
		Reag.	%	IC95% (%)	Reag.	%	IC95% (%)	Reag.	%	IC95% (%)
SP	651	169	26,0	22,6-29,3	185	28,4	25,0-31,9	258	39,6	35,9-43,4
SC	277	147	53,1	47,2-58,9	148	53,4	47,6-59,3	164	59,2	53,4-65,0
PR	256	64	25,0	19,7-30,3	68	26,6	21,2-32,0	137	53,5	47,4-59,6
MS	100	37	37,0	27,5-46,5	38	38,0	28,5-47,5	39	39,0	29,4-48,6
Total	1.284	417	32,5	29,9-35,0	439	34,2	31,6-36,8	598	46,6	43,8-49,3

UF = Unidade da Federação (SP = São Paulo; SC = Santa Catarina; PR = Paraná; MS = Mato Grosso do Sul)

Reag. = reagentes

IC = intervalo de confiança

O emprego da MAT para detecção de anticorpos anti-*leptospira* spp. em 1.284 amostras de soro sanguíneo de suínos com uma coleção de 33 antígenos permitiu a detecção de um maior número de amostras positivas comparado ao resultado encontrado empregando uma coleção de 24 sorovares de referência (Tabela 3). O teste de McNemar revelou diferença significativa ($P = 7,562 \times 10^{-6}$) entre os resultados do teste com o acréscimo de nove estirpes autóctones brasileiras à coleção de referência. O intervalo de confiança da diferença de proporções para amostras relacionadas foi de 1,00% - 2,42%, demonstrando diferença significativa, pois o intervalo não inclui o valor zero.

Tabela 3. Tabela de contingência comparando os resultados encontrados no MAT utilizando uma coleção com 24 e 33 antígenos (Ag), para o diagnóstico sorológico da leptospirose em suínos.

24 Ag	33 Ag		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	417	0	417
Negativo	22	845	867
Total	439	845	1.284

Teste de Mc Nemar: $P = 7,562 \times 10^{-6}$ - diferença significativa

IC = 1,00% - 2,42% - diferença significativa entre as proporções (1,71%), porque o intervalo não inclui o valor zero.

Comparando os resultados encontrados no MAT utilizando coleções de 24 e de 38 antígenos, observou-se $P < 2,2 \times 10^{-16}$ no teste de McNemar, demonstrando que houve uma diferença significativa do teste com o emprego de quatorze estirpes autóctones brasileiras a coleção de referência. O intervalo de confiança da diferença de proporções para amostras relacionadas foi de 12,19% - 16,00%, demonstrando diferença significativa (tabela 4).

Tabela 4. Tabela de contingência comparando os resultados encontrados no MAT utilizando uma coleção com 24 e 38 antígenos (Ag), para o diagnóstico sorológico da leptospirose em suínos.

24 Ag	38 Ag		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	417	0	417
Negativo	181	686	867
Total	598	686	1.284

Teste de Mc Nemar: $P < 2,2 \times 10^{-16}$ - diferença significativa

IC = 12,19% - 16,00% - diferença significativa entre as proporções (14,1%), porque o intervalo não inclui o valor zero.

A comparação dos resultados encontrados no MAT utilizando coleções de 33 e de 38 antígenos demonstrou diferença significativa, sendo a diferença entre as coleções a adição de 5 estirpes autóctones isoladas de suínos das áreas estudadas. Nessa avaliação, o valor de $P < 2,2 \times 10^{-16}$ no teste de McNemar e o intervalo de confiança da diferença de proporções para amostras relacionadas de 10,58% - 14,18% (tabela 5) atestam essa diferença.

Tabela 5. Tabela de contingência comparando os resultados encontrados no MAT utilizando uma coleção com 33 e 38 antígenos (Ag), para o diagnóstico sorológico da leptospirose em suínos.

33 Ag	38 Ag		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	439	0	439
Negativo	159	686	845
Total	598	686	1.284

Teste de Mc Nemar: $P < 2,2 \times 10^{-16}$ – diferença significativa

IC = 10,58% - 14,18% - diferença significativa entre as proporções (12,38%), porque o intervalo não inclui o valor zero.

Em relação ao número de reagentes por estado de origem dos animais avaliados, observou-se que um número considerável de amostras negativas na coleção de antígenos de referência foi reagente quando adicionadas as estirpes autóctones. Esse número foi ainda mais notável quando se adicionaram os sorovares autóctones obtidos dos suínos do estudo (Tabela 2). As reações tiveram títulos variando de 100 a 3.200 (Tabela 6).

Tabela 6. Resultado do teste de soraglutinação microscópica para o diagnóstico da leptospirose suína, segundo espécie, sorogrupo, sorovar e frequência dos títulos dos sorovares reagentes. Brasil, 2016.

Espécie	Sorogrupo	Sorovar ou Estirpe	Títulos no MAT						Total
			100	200	400	800	1600	3200	
<i>L. biflexa</i>	Andamana	Andamana	11	0	0	0	0	0	11
<i>L. biflexa</i>	Semarang	Patoc	27	8	0	0	0	0	35
<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Castellonis	3	1	0	0	0	0	4
<i>L. borgpetersenii</i>	Celledoni	Whitcombi	0	0	0	0	0	0	0
<i>L. borgpetersenii</i>	Javanica	Javanica	0	0	0	0	0	0	0
<i>L. borgpetersenii</i>	Tarassovi	Tarassovi	0	0	0	0	0	0	0
<i>L. interrogans</i>	Australis	Australis	0	1	1	0	0	0	2
<i>L. interrogans</i>	Australis	Bratislava	115	8	2	1	0	0	126
<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Autumnalis	21	5	0	0	0	0	26
<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Unesp02	19	6	0	0	0	0	25
<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Unesp04	11	8	1	0	0	0	20
<i>L. interrogans</i>	Bataviae	Bataviae	0	0	0	0	0	0	0
<i>L. interrogans</i>	Bataviae	BRA	1	0	0	0	0	0	1
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	1	1	0	0	0	0	2
<i>L. interrogans</i>	Canicola	LO4	14	10	0	0	0	0	24
<i>L. interrogans</i>	Canicola	LO14	4	1	0	0	0	0	5
<i>L. interrogans</i>	Djasiman	Sentot	7	0	0	0	0	0	7
<i>L. interrogans</i>	Hebdomadis	Goiano	7	0	0	0	0	0	7
<i>L. interrogans</i>	Hebdomadis	Hebdomadis	1	0	0	0	0	0	1
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	12	4	0	0	0	1	17
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	223	54	12	1	0	0	290
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	LO10	9	0	0	0	0	0	9
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Unesp01	194	91	21	7	0	0	313
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Unesp05	218	76	20	7	0	0	321
<i>L. interrogans</i>	Pomona	GR6	0	1	0	0	0	0	1
<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona	1	0	0	1	0	0	2
<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Pyrogenes	13	1	1	0	0	0	15
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Hardjoprajitno	2	0	0	0	0	0	2
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Wolffi	15	4	0	0	0	0	19
<i>L. kirschneri</i>	Autumnalis	Butembo	7	1	0	0	0	0	8
<i>L. kirschneri</i>	Cynopteri	Cynopteri	0	0	0	0	0	0	0
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	2ACAP	1	0	0	0	0	0	1
<i>L. kirschneri</i>	Pomona	110/06	2	0	0	0	0	0	2
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	0	2	0	0	0	0	2
<i>L. noguchi</i>	Panama	Panama	8	1	1	0	0	0	10
<i>L. santarosai</i>	Sejroe	Guaricura	7	0	0	0	0	0	7
<i>L. santarosai</i>	Sejroe	Unesp03	6	1	0	0	0	0	7
<i>L. santarosai</i>	Shermani	Shermani	8	3	0	0	0	0	11

Levando em conta o critério de desconsiderar da análise amostras nas quais o título mais alto foi idêntico contra dois ou mais antígenos, foram descartadas 68 (16,3%) de 417 amostras sororreagentes obtidas com a coleção de 24 antígenos, 79 (18,0%) das 439 amostras sororreagentes com a coleção de 33 antígenos e 253 (42,3%) das 598 amostras sororreagentes na coleção ampliada para 38 antígenos. Desta forma, foram utilizadas nessa apreciação 349, 360 e 345 amostras sororreagentes nas coleções com 24, 33 e 38 antígenos, respectivamente (Tabela

7). Os sorovares mais prováveis identificados quando utilizada a coleção de 24 sorovares foram: Icterohaemorrhagiae (61,60%), Bratislava (16,61) e Patoc (6,59%). Com a coleção de 33 antígenos, à qual foram adicionadas nove estirpes autóctones do Brasil, os sorovares mais prováveis identificados, continuaram sendo os mesmos, alterando apenas a frequência, Icterohaemorrhagiae (58,61%), Bratislava (5,27) e Patoc (5,83%). Já quando adicionadas as estirpes regionais, o perfil foi alterado, sendo os sorovares mais prováveis: Unesp05 (28,40%), Icterohaemorrhagiae (23,76%) e Unesp01 (13,62%).

Quando avaliados os antígenos que se mostraram mais prováveis por Estado, em Santa Catarina e no Mato Grosso do Sul, independentemente da coleção utilizada, o mais frequente foi o Icterohaemorrhagiae. Já em São Paulo e no Paraná, os resultados do MAT com as coleções de 24 e de 33 antígenos não apresentaram diferença, definindo os sorovares Icterohaemorrhagiae e Bratislava como mais prováveis, respectivamente. No entanto, utilizando a coleção de 38 antígenos, o sorovar Unesp05 foi o que se apresentou, mais vezes, como o sorovar mais provável (Tabela 8).

Tabela 7. Sorovar de *Leptospira* mais provável identificado em inquérito sorológico efetuado pelo teste de soroaglutinação microscópica em 1.284 suínos adultos, abatidos no Estado de São Paulo, segundo a coleção de antígenos (24, 33 e 38 antígenos)

Sorogrupo	Sorovar ou Estirpe	Mais provável (24 sorovares)	Mais provável (33 sorovares)	Mais provável (38 sorovares)
Andamana	Andamana	5	4	4
Australis	Australis	2	2	1
Australis	Bratislava	58	55	36
Autumnalis	Autumnalis	11	11	7
Autumnalis	Butembo	4	4	3
Autumnalis	Unesp02	0	0	1
Autumnalis	Unesp04	0	0	4
Ballum	Castellonis	2	2	2
Bataviae	Bataviae	0	0	0
Bataviae	BRA	0	1	1
Canicola	Canicola	1	0	0
Canicola	LO4	0	18	18
Canicola	LO14	0	1	1
Celledoni	Whitcombi	0	0	0
Cynopteri	Cynopteri	0	0	0
Djasiman	Sentot	2	2	2
Grippotyphosa	2ª – CAP	0	0	0
Grippotyphosa	Grippotyphosa	1	1	0
Hebdomadis	Goiano	0	1	1
Hebdomadis	Hebdomadis	0	0	0
Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	3	3	2
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	215	211	82
Icterohaemorrhagiae	LO10	0	2	1
Icterohaemorrhagiae	Unesp01	0	0	47
Icterohaemorrhagiae	Unesp05	0	0	98
Javanica	Javanica	0	0	0
Panama	Panama	1	1	1
Pomona	GR6	0	0	0
Pomona	Pomona	0	0	0
Pomona	110/06	0	0	0
Pyrogenes	Pyrogenes	6	6	5
Sejroe	Guaricura	0	2	1
Sejroe	Hardjoprajitno	0	0	0
Sejroe	Wolffi	8	6	6
Semarang	Patoc	23	21	15
Sejroe	Unesp03	0	0	2
Shermani	Shermani	7	6	4
Tarassovi	Tarassovi	0	0	0

Tabela 8. Principais sorovares de *Leptospira* apontados como mais prováveis, por estado, identificados em inquérito sorológico efetuado pelo teste de soroaglutinação microscópica em 1.284 suínos adultos, abatidos no Estado de São Paulo, segundo a coleção de antígenos (24, 33 e 38 antígenos)

Estado		Mais provável (24 sorovares)	Mais provável (33 sorovares)	Mais provável (38 sorovares)
São Paulo	1°	Icterohaemorrhagiae (88)	Icterohaemorrhagiae (87)	Unesp05 (48)
	2°	Bratislava (16)	Bratislava (16)	Icterohaemorrhagiae (24)
	3°	Patoc (12)	Patoc (10)	Unesp01 (19)
Santa Catarina	1°	Icterohaemorrhagiae (91)	Icterohaemorrhagiae (89)	Icterohaemorrhagiae (42)
	2°	Bratislava (10)	Bratislava (9)	Unesp05 (21)
	3°	Andamana (3) e Shermani (3)	Andamana (3) e Shermani (3)	Unesp01 (7)
Paraná	1°	Bratislava (25)	Bratislava (23)	Unesp5 (25)
	2°	Icterohaemorrhagiae (21)	Icterohaemorrhagiae (21)	Unesp01 (16)
	3°	Patoc (9)	Patoc (9)	Bratislava (11)
Mato Grosso do Sul	1°	Icterohaemorrhagiae (15)	Icterohaemorrhagiae (14)	Icterohaemorrhagiae (10)
	2°	Bratislava (7)	Bratislava (7)	Bratislava (7)
	3°	Patoc (2)	Patoc (2)	Unesp01 (5)

() = número de amostras nas quais o sorovar em questão foi considerado o mais provável.

Apesar da observação de diferentes sorovares e sorogrupos como mais prováveis, 464 das 598 amostras, 77,59%, apresentaram-se reagentes ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae. Esse sorogrupo se destacou, também, como mais provável, independentemente da coleção de antígenos utilizada (Tabela 5), e 154 das 181 amostras, 85,08%, que só reagiram após a adição das estirpes autóctones, foram positivas para o sorogrupo Icterohaemorrhagiae (tabela 9), demonstrando a importância da presença de antígenos desse sorogrupo para o diagnóstico da leptospirose suína.

Tabela 9. Discriminação das 181 amostras consideradas negativas no teste de soroaglutinação microscópica para diagnóstico de leptospirose com a utilização da coleção de 24 sorovares e que se tornaram reativas com a inserção das estirpes autóctones, considerando estirpes de presentes, nº de reagentes e estado de origem dos suínos testados.

Estirpes Presentes	Origem dos animais	nº de reagentes	Total acumulado
Unesp01, Unesp05	Paraná	39	70
	São Paulo	27	
	Santa Catarina	4	
	Total	70	
Unesp05	São Paulo	36	130
	Paraná	15	
	Santa Catarina	9	
	Total	60	
Unesp01	Paraná	9	146
	São Paulo	6	
	Mato Grosso do Sul	1	
	Total	16	
LO4	São Paulo	10	159
	Paraná	3	
	Total	13	
Unesp04	São Paulo	2	163
	Paraná	2	
	Total	4	
Unesp02, Unesp04	Santa Catarina	1	165
	Paraná	1	
	Total	2	
Unesp04, Unesp05	Paraná	2	167
	Total	2	
Unesp02, Unesp04, Unesp05	Paraná	1	169
	São Paulo	1	
	Total	2	
Unesp02	Paraná	1	170
	Total	1	
LO14, LO4, Unesp05	Paraná	1	171
	Total	1	
Unesp01, Unesp02, Unesp03, Unesp05	São Paulo	1	172
	Total	1	
L010, Unesp05	São Paulo	1	173
	Total	1	
L014, LO4	São Paulo	1	174
	Total	1	
Unesp03	Paraná	1	175
	Total	1	
Guaicurus, Unesp03	São Paulo	1	176
	Total	1	
BRA	Paraná	1	177
	Total	1	
LO14	São Paulo	1	178
	Total	1	
LO10	São Paulo	1	179
	Total	1	
Guaicurus	Mato Grosso do Sul	1	180
	Total	1	
Goiano	Paraná	1	181
	Total	1	

DISCUSSÃO

Assim como em outros trabalhos (Brod et al., 2005; Sarmiento et al., 2012), a inserção de estirpes autóctones na coleção de antígenos permitiu detectar animais reagentes que teriam sido considerados negativos com a utilização de uma coleção com apenas os sorovares de referência, pois todo teste sorológico pode ter resultados falso-negativos, e no MAT essa falha pode ocorrer pela ausência do sorovar causador da enfermidade na coleção utilizada no teste, refletindo diretamente na acurácia do teste (Seyffert et al., 2004).

Quando se comparou a adição de nove estirpes autóctones do Brasil isoladas de outras regiões, em maioria, de espécies diferentes a testada, com a adição de cinco isolados da mesma espécie e região dos animais de estudo, pôde-se observar uma diferença significativa no teste (tabela 5), com a detecção de mais 159 amostras, ou seja, acréscimo de 12,38 pontos percentuais na proporção de animais positivos no teste. Tanto na amostra total quanto nas amostras por estado de origem, a adição de estirpes autóctones elevou o número de animais positivos no teste (tabelas 2, 3, 4 e 5).

Dentre as estirpes autóctones utilizadas, as que mais se destacaram, por terem reagido em um maior número de animais (tabelas 6 e 9) e por terem sido consideradas mais prováveis (tabelas 7 e 8), foram: Unesp05, Unesp01, Unesp02, LO4 e Unesp04 (tabelas 4 e 5), todas obtidas de amostra de órgãos ou urina de suínos (tabela 1). Com a adição, apenas, dessas cinco estirpes à coleção do MAT, ou seja, usando uma coleção de 29 antígenos, 174 amostras que haviam sido consideradas negativas passaram a ser positivas (tabela 9), com títulos de 100 a 800. É importante ressaltar que essas estirpes reagiram também em outras amostras, assim como outros sorovares da coleção padrão, de referência, sendo contabilizadas nessa avaliação apenas as amostras em que a adição das estirpes alterou o resultado de não reagente para reagente.

Com excessão da estirpe LO4, isolada de fígado de um suíno abatido no Estado do Paraná, as demais estirpes que se destacaram foram isoladas de suínos abatidos no Estado de São Paulo (Unesp01, Unesp02, Unesp04 e Unesp05), sendo a Unesp01 e a Unesp04 obtidas de amostra extraída de suínos oriundos do Estado

de São Paulo, a Unesp 02 de suíno criado em uma granja do Paraná e a Unesp05 de suíno do Mato Grosso do Sul.

A presença da estirpe LO4 foi responsável por detectar 15 amostras como reagentes, antes consideradas negativas, sendo 13 amostras reagentes apenas a essa estirpe; os suínos positivos eram dos estados do Paraná e de São Paulo (tabela 9). A estirpe Unesp05 foi capaz de detectar como reagentes 137 amostras antes consideradas negativas, entre elas, 60 amostras de soros que apenas essa estirpe foi capaz de detectar, com títulos de 100 a 800 (tabela 9). A Unesp01 foi responsável por detectar reação em 87 amostras, sendo a única a reagir em 16 delas. Já a Unesp02 e a Unesp04 detectaram 6 e 8 amostras positivas, respectivamente; ambas são estirpes do sorovar e sorogrupo Autumnalis (tabela 1), no entanto o resultado foi o mesmo em apenas 4 amostras (tabela 9).

Apesar de diferentes estirpes pertencerem ao mesmo sorovar e/ou sorogrupo, elas podem reagir de formas distintas na coleção de antígenos, por terem sido isoladas de animais de diferentes granjas e regiões do Brasil, como LO10, Unesp01 e Unesp05, isoladas de animais provenientes dos estados do Paraná, São Paulo e Mato Grosso do Sul, respectivamente, e os isolados Unesp02 e Unesp04, ambos do sorogrupo Autumnalis, mas isolados de animais provenientes dos estados do Paraná e São Paulo, demonstrando a particularidade de cada isolado, e que o emprego de estirpes semelhantes, mas originadas de animais de regiões e realidades climáticas e geográficas diferentes, é importante para ampliar o espectro de identificação e simultaneamente tornar o teste mais atrativo, possibilitando a detecção de estirpes que estão circulando em diferentes animais e estados brasileiros.

Assim como no presente trabalho, Sarmento e colaboradores (2012) observaram que o emprego de estirpes autóctones elevou o número de positivos em estudo com bovinos, ao utilizarem dez estirpes autóctones em um levantamento sorológico de estados brasileiros. Das dez estirpes, seis foram utilizadas também no presente trabalho, no entanto, Sarmento e colaboradores observaram que a estirpe que demonstrou melhor resultado e com maior frequência, sendo o sorovar mais provável, foi a estirpe Guaricura, diferente do presente trabalho. No entanto, o trabalho se tratava de um levantamento sorológico de bovinos, e a estirpe em

questão foi isolada de bubalino; já as estirpes que se destacaram no presente trabalho foram isoladas de suínos.

De forma semelhante, outros autores observaram contribuição positiva na inserção de estirpes autóctones na coleção de antígenos utilizada para o diagnóstico da leptospirose no país. Inquéritos sorológicos realizados em outras espécies animais, domésticas e de produção, adicionando estirpes autóctones do Brasil, demonstraram aumento na observação de animais positivos no MAT, como no estudo envolvendo bovinos no Estado de Minas Gerais, que apontou aumento de 4% (Araújo et al., 2005) a 12,7% (Pereira et al., 2004) na detecção de positivos com o emprego da estirpe Norma do sorovar Hardo. Em inquérito sorológico de cães no Rio Grande do Sul, com a adição da estirpe Tande, do sorovar Canicola, na coleção de antígenos, observou-se um aumento de 19% de cães positivos (Brod et al., 2002). Seyffert e colaboradores (2004) encontraram uma porcentagem ainda maior de aumento, 64,96% quando adicionados à coleção padrão, recomendada pela OMS, 10 isolados locais na sorologia de humanos no Rio Grande do Sul.

Em relação a todas as amostras reagentes, sorovares de referência e estirpes, os sorovares mais prováveis identificados quando utilizadas as coleções de 24 e 33 sorovares foram: Icterohaemorrhagiae, Bratislava e Patoc. Já quando adicionadas as estirpes regionais, o perfil foi alterado, sendo os sorovares mais prováveis: Unesp05, Icterohaemorrhagiae e Unesp01 (tabela 8). O sorovar Icterohaemorrhagiae e as estirpes Unesp01 e Unesp05 pertencem ao mesmo sorogrupo Icterohaemorrhagiae. Foram evidenciados como sorogrupos mais prováveis no presente trabalho: Icterohaemorrhagiae, Australis e Semaranga.

Há anos (Oliveira et al., 1994; Shimabukuro et al., 2003), inquéritos sorológicos com predominância dos sorogrupos Icterohaemorrhagiae e Australis vem sendo descritos em suínos, dado preocupante, pois esses sorovores têm o potencial de causar problemas reprodutivos em fêmeas, sendo responsáveis pelo descarte precoce de matrizes (Carvalho et al., 1990).

Uma das explicações para o destaque do sorogrupo Icterohaemorrhagiae é que roedores sinantrópicos, muitas vezes presentes em granjas suínas, são os principais reservatórios e responsáveis pela disseminação deste patógeno no ambiente, possibilitando a infecção dos suínos pelo contato direto ou indireto com a

urina desses animais (Shimabukuro et al., 2003), sendo alvo de grande preocupação por ser considerado o sorogrupo mais patogênico para humanos e relacionado com casos mais graves da doença, constituindo desta forma um problema de saúde pública (Ministério da Saúde, 2009). Já o sorogrupo Australis, em especial o sorovar Bratislava, é considerado adaptado aos suínos, com rápida transmissão entre os suínos da granja, e provocando com sinais clínicos que podem ser de leves a graves, gerando severas perdas reprodutivas, e normalmente, se não tratado corretamente, o suíno pode se tornar portador renal, por um período prolongado, que acarreta grandes perdas econômicas para a granja (Ellis et al. 1986) e um risco de saúde pública para a região, pois o suíno pode eliminar as leptospiros viáveis no ambiente e ser responsável pela disseminação da doença a tratadores e pessoas que entrarem em contato com sua urina e/ ou órgãos com a presença do agente, como os magareferes.

O sorogrupo Semarang, diferentemente dos demais, é uma leptospira saprófita, encontrada frequentemente em sorologia de animais selvagens, como os javalis (Marchiori Filho et al., 2002), que pertencem à mesma família dos suínos. Estudos demonstraram que sorovares de leptospiros saprófitas podem aglutinar com soros contendo anticorpos contra leptospiros patogênicas, principalmente os pertencentes ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae (Romero et al., 2003), podendo o resultado contabilizado para esse sorogrupo ser uma reação cruzada ou inespecífica com algum sorogrupo patogênico (Girio e Mathias, 1988).

Diante do apresentado, podemos observar, assim como Sanchez e colaboradores (2016), que a sensibilidade do MAT foi melhorada com a inclusão de estirpes autóctones locais e que diante das informações obtidas na sorologia é possível indicar qual estirpe está circulando no ambiente e tentar desenvolver vacinas mais eficazes e regionais, considerando esses sorovares em sua composição antigênica.

Além disso, o sorogrupo Icterohaemorrhagiae foi o mais presente no inquérito sorológico, dado preocupante, pois indica a circulação de leptospiros desse sorogrupo entre os animais, estimulando o sistema imune e passível de causar a doença nessa espécie. Ademais, o suíno, quando em estado de portador renal, pode

eliminar a leptospira no meio em áreas coabitadas por outras espécies, como o ser humano, possibilitando sua infecção.

Os resultados encontrados, ainda, sugerem a importância de associar a sorologia ao isolamento. Em situações em que tenha sido possível obter um isolado, este deve ser adicionado à coleção de antígenos, para que em um próximo momento, em situações em que não seja possível ou viável o isolamento, a estirpe encontrada anteriormente possa ser utilizada na tentativa de obter resultados mais precisos no teste sorológico.

No entanto, muitas vezes o emprego de uma coleção extensa de antígenos pode não ser viável na rotina de um laboratório de diagnóstico de leptospirose. Com base nos resultados encontrados, em que as estirpes de maior frequência têm origem na mesma espécie estudada e em regiões em comum, observamos que o mais adequado, quando há impossibilidade de utilizar toda a coleção de antígenos disponíveis, é adequar a coleção a cada espécie estudada, mas para isso é necessário conhecer as estirpes disponíveis, informações como espécie de origem do isolado, bem como região e época do isolamento, e se o sorovar/sorogrupo ao qual a estirpe de leptospira pertence tem relevância para a espécie em estudo.

Conclusões

A inclusão de estirpes autóctones isoladas no Brasil à coleção de antígenos da MAT propiciou o aumento significativo do número de suínos identificados como positivos no sorodiagnóstico de leptospirose, especialmente quando as estirpes são de origem da mesma espécie e região do estudo. Esse dado ressalta a importância dessa inclusão nas coleções de antígenos dos laboratórios de diagnóstico em todo o Brasil.

Quanto ao resultado da sorologia, grande parte das amostras testadas apresentou títulos ≥ 100 contra o sorogrupo icterohaemorrhagiae, demonstrando que é um sorogrupo predominante nas granjas de suínos avaliadas no presente estudo, e que se deve ter atenção a esta doença nas granjas, não só para prevenir perdas

econômicas e injúrias aos animais, mas também para minimizar as possibilidades de disseminação deste patógeno de tanta importância para saúde pública.

Referências

Altman DG (1999) **Practical statistics for medical research**. Chapman & Hall/CRC, 611 p.

Araújo VEM, Moreira EC, Naveda LAB, Silva JÁ, Contreras RL (2005) Frequência de aglutininas anti-*Leptospira interrogans* em soros sanguíneos de bovinos, em Minas Gerais, de 1980 a 2002. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 57(4): 430-435.

Brod CS, Aleixo JAG, Jouglard SDD, Fernandes CPH, Teixeira JLR, Krahll M, Dellagostin AO (2002) The importance of the use of a local isolate of leptospira on detection of antibody in human and canine serum samples. **3rd meeting internacional of leptospirosis. Internacional Leptospirosis Society**. Barbados 99p.

Brod CS, Aleixo JAG, Jouglard SDD, Fernandes CPH, Teixeira JLR, Dellagostin OA (2005) Evidência do cão como reservatório da leptospirose humana: isolamento de um sorovar, caracterização molecular e utilização em inquérito sorológico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 38(4): 294-300.

Carvalho LFOS, Carvalho MB, Girio RJS, Mathias LA, Franceschini PH, Massaio N, Pinheiro LEL (1990) Investigação sorológica de fêmeas suínas descartadas para abate por transtornos reprodutivos diversos. *Ciência Veterinária Jaboticabal* 4(2): 6-8.

Ellis WA, O'brien JJ, Bryson DG (1986) Bovine leptospirosis: Experimental serovar hardjo infection. **Veterinary Microbiology** 11: 293-299.

Faine S, Adler B, Boein C, Perolat P (1999) **Leptospira and Leptospirosis**. MedSci. Melbourne: Australia, 2. ed. 295 p.

Girio RJS, Mathias LA (1988) Use of saprophytic *Leptospira* strains in the serodiagnosis of experimental leptospirosis in guinea-pigs (*Cavia* sp). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** 30(2):91-94.

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

Marchiori Filho M, Girio RJS, Lui JF, Mathias LA, Brasil ATR (2002) Estudo sorológico para leptospirose em populações de diferentes grupos genéticos de javalis (*Sus scrofa scrofa*, Linnaeus, 1758) dos estados de São Paulo e Paraná. **Arquivos do Instituto Biológico**, 69: 101-104.

Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica (2009) **Guia de vigilância epidemiológica**. 7º ed. Brasília 816 p.

Naotunna C, Suneth Agampodi SB, Agampodi TC (2016) Etiological agents causing leptospirosis in Sri Lanka: A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine** 9(4): 390-394.

OIE - World Organisation for Animal Health (2014) **Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals**. Paris, 1404 p. Disponível em: <www.oie.int>. Acesso em: 05 abr. 2018.

Oliveira SJ, Borowski SM, Barcellos DESN (1994) Evidências de infecção por *Leptospira* bratislava em casos de transtornos reprodutivos em suínos. **Ciência Rural** 24(2): 345-348.

Oliveira SJ (1999) Nova ameaça à reprodução em suínos, além da leptospirose? **A Hora Veterinária** 19(111): 87-90.

Pereira PAC, Ferreira AM, Carvalho LB, Oliveira Junior AC, Rodrigues RO, Leite RC (2004) Perfil sorológico das leptospiroses em rebanhos bovinos leiteiros da região do Vale do Paraíba - SP. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 28(3): 174-176.

Romero EC, Bernardo CCM, Yasuda PH (2003) Human leptospirosis: A twenty-nine-year serological study in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** 45(5): 245-48.

Sanchez RGP, Lopez JA, Pereira MM, Naranjo MAN, Agudelo-Flórez P (2016) Genetic diversity of *Leptospira* in northwestern Colombia: First report of *Leptospira santarosai* as a recognised leptospirosis agent. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 111(12): 737-744.

Sarmiento AMC, Azevedo SS, Moraes ZM, Souza GO, Oliveira FCS, Gonçalves AP, Miraglia F, Vasconcellos 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** 32: 601-606.

Seyffert N, Bermudez VL, Recuero A, Bourscheidt D, Brod CS (2004) Importância do uso de isolados locais de leptospirose na detecção de anticorpos em humanos suspeitos de leptospirose. In: Congresso de iniciação científica. 13º Encontro de pós-graduação, Pelotas. **Anais.** Disponível em: http://www2.ufpel.edu.br/cic/2004/arquivos/conteudo_CB.html#00865. Acesso em: 17 ago. 2018.

Shimabukuro FH, Domingues PF, Langoni H, Silva AV, Pinheiro JP, Padovani CR (2003) Pesquisa de suínos portadores renais de leptospirose 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** 40: 243-253.

Thrusfield MV (2005) **Veterinary epidemiology**. 3. ed. Ames: Blackwell Publishing Professional 610 p.

Vasconcellos SA, Barbarini Junior O, Umehara O, Moraes ZM, Cortez A, Pinheiro SR, Ferreira F, Fávero ACM, Ferreira Neto JS (1997) Leptospirose bovina. Níveis de ocorrência e sorotipos predominantes em rebanhos dos estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul. Período de Janeiro a Abril de 1996. **Arquivos do Instituto Biológico** 64(2): 7-15.

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 leptospirosas 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 - SISP, 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 leptospiros 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 leptospiros 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 leptospirosas 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 leptospirosas da mesma espécie, sorogrupo e região do isolamento, o que demonstrou que esses fatores podem influenciar a evolução genética das leptospirosas 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 leptospirosas 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.

APENDICE I - QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO

1. DADOS DA COLETA

Código no estudo:

Data da coleta das amostras: __/__/__

Quantidade de animais:

Matadouro-frigorífico coletado:

2. INFORMAÇÕES DA PROPRIEDADE

Nome da propriedade:

Nome do proprietário:

Telefone(s) de contato:

Endereço:

Município/UF:

Coordenadas geográficas (latitude e longitude):

3. COMPOSIÇÃO DA GRANJA

Linhagem dos suínos da propriedade:

Média de abortamentos dos suínos no mês de coleta:

Possui outros animais (Especificar o número de animais):

Bovino de leite / de corte:

Caprino / Ovino:

Equino:

Aves:

Cães / Gatos:

Animais silvestres:

Outros:

4. QUESTIONAMENTO-BASE (Respostas sim/não e observações)

- I. A suinocultura é sua principal fonte de renda?
- II. A aquisição de animais é de granjas certificadas (GRSC)?
- III. Observa com frequência a presença de roedores/ratos?
- IV. Usa antibiótico nos animais da granja?
- V. Respeita o período de carência desses medicamentos?
- VI. Os animais fazem algum exame durante a estadia na granja?
- VII. Os animais recebem alguma vacinação durante a estadia na granja?
- VIII. Faz quarentena após a retirada dos animais?
- IX. Possui área de quarentenário ou enfermaria?
- X. Ocorreram problemas reprodutivos nos suínos da propriedade?
- XI. Ocorreram problemas reprodutivos nos ruminantes da propriedade?
- XII. Fez aquisição de animais na propriedade nos últimos 6 meses?
- XIII. Existem suínos nas propriedades vizinhas?
- XIV. Usa algum tipo de EPI no manejo dos animais?
- XV. A pessoa que trata dos suínos também faz o trato de outros animais?
- XVI. A propriedade tem biodigestor ?

XVII. Como é a composição da granja?

SUÍNOS	QUANTIDADE
Matrizes	
Cachaços	
Leitões maternidade	
Leitões creche	
Leitões terminação	
Total	

5. QUESTIONAMENTO SOBRE BIOSSEGURANÇA (Respostas sim/não e observações)

- I. Possui cerca ao redor da granja?
- II. Possui cinturão verde?
- III. Funcionários tomam banho antes do trabalho
- IV. Têm vestiário próprio e usam uniforme da granja?
- V. Caminhões de fora entram na propriedade?
- VI. Caminhões são lavados e desinfetados?
- VII. Existe veículo de transporte interno na granja?
- VIII. Há livro de registro de visitas?
- IX. Lava e desinfeta instalações?
- X. Introdução de materiais e equipamentos na granja?
- XI. Tem muitas moscas?
- XII. Visitantes respeitam vazão sanitário (72 horas)

6. QUESTIONAMENTO SOBRE O SISTEMA DE CRIAÇÃO (Assinalar a(s) alternativas condizentes a realidade da propriedade)

I. Sistema de criação

- () Sistema intensivo de suínos criados ao ar livre (Siscal)
 () Sistema intensivo - confinado tradicional
 () Sistema intensivo - confinados sobre cama
 () Sistema extensivo - subsistência, confinado

II. Principais problemas de saúde dos suínos

- () Respiratórios () Pele
 () Intestinais/diarreia () Outros . Quais? _____

III. Destino de carcaças – óbitos na granja

- () Céu aberto () Enterra
 () Incinera () Outro (detalhar) _____

IV. Origem da água utilizada na granja

- () Abastecimento público () Poço
 () Lagoa/Açude () Rio
 () Nascente

V. A água é tratada/clorada () Sim () Não

VI. Frequência da higienização das instalações

() Diária () Semanal

() Mensal () Esporadicamente

VII. A propriedade recebe assistência veterinária específica para a granja

() Diariamente () uma visita por semana

() uma visita por mês () Outra: _____

7. QUESTIONAMENTO SOBRE ZOONOSES

I. Sabe o que são zoonoses () Sim () Não

II. Acha que zoonoses são:

() Doenças transmissíveis entre animais e humanos

() Doenças que só afetam animais

() Doenças que só afetam os humanos

III. Quais das doenças você reconhece como sendo zoonose?

() Tuberculose () Raiva

() Leptospirose () Brucelose

() Toxoplasmose () Cisticercose

() Outras. _____

IV. Acha que sangue e urina dos animais são capazes de transmitir doenças ao homem? () Sim () Não

V. Já ouviu sobre leptospirose? () Sim () Não

VI. Já teve icterícia? () Sim () Não

VII. Participaria de algum treinamento sobre sanidade de animais e zoonoses?

() Sim () Não