ISRAEL BARBOSA GUEDES

**Pesquisa de *Leptospira* spp. em fêmeas bovinas pertencentes ao
município de Novo Repartimento - Pará**

São Paulo
2017

ISRAEL BARBOSA GUEDES

Pesquisa de *Leptospira* spp. em fêmeas bovinas pertencentes ao município de Novo Repartimento - Pará

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Marcos Bryan Heinemann

São Paulo

2017

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3511
FMVZ

Guedes, Israel Barbosa

Pesquisa de *Leptospira* spp. em fêmeas bovinas pertencentes ao município de Novo Repartimento - Pará. / Israel Barbosa Guedes. -- 2017.
73 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Bryan Heinemann.

1. Pará. 2. Novo Repartimento. 3. Leptospirose bovina. 4. Sequenciamento.
I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Pesquisa de *Leptospira* spp em fêmeas bovinas pertencentes ao município de Novo Repartimento - PA", protocolada sob o CEUA nº 5893100816, sob a responsabilidade de **Marcos Bryan Heinemann e equipe; Israel Barbosa Guedes** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 03/01/2017.

We certify that the proposal "Research of *Leptospira* spp . in cows belonging to the Novo Repartimento county - Pará", utilizing 200 Bovines (200 females), protocol number CEUA 5893100816, under the responsibility of **Marcos Bryan Heinemann and team; Israel Barbosa Guedes** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 01/03/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **09/2016** a **11/2016**

Área: **Medicina Veterinária Preventiva E Saúde Animal**

Origem: **Animais provenientes de estabelecimentos comerciais**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **12 a 36 meses**

N: **200**

Linhagem: **Mestiços**

Peso: **700 a 1200 kg**

Resumo: A leptospirose bovina está presente na região de Novo Repartimento e no estado do Pará, constatada apenas por meios sorológicos. Assim, o presente estudo pretende detectar a infecção por *Leptospira* spp. por meio de ensaio sorológico, bacteriológico e molecular em fêmeas bovinas da região de Novo Repartimento, estado do Pará. Como metodologia, serão colhidas amostras de sangue para obtenção do soro sanguíneo, urina e fragmentos de rins dos animais durante a linha de abate em um matadouro municipal. Os testes empregados serão a Soroaglutinação Microscópica (SAM) para pesquisa de anticorpos contra *Leptospira* spp., o cultivo bacteriológico e a reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detecção do agente. As amostras positivas no cultivo e na PCR serão submetidas ao sequenciamento de DNA para a determinação da espécie, sorogrupo ou sorovar mais provável.

Local do experimento: não se aplica

São Paulo, 16 de maio de 2017

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

São Paulo, 10 de maio de 2017
CEUA N 5893100816

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Marcos Bryan Heinemann
Área: Medicina Veterinária Preventiva E Saúde Animal

Título da proposta: "Pesquisa de Leptospira spp em fêmeas bovinas pertencentes ao município de Novo Repartimento - PA".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ/USP

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 10/abril/2017) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Ao fazer a qualificação, a banca examinadora pediu que houvesse uma mudança no título do projeto, o atual e que foi aprovado pela CEUA é "Pesquisa de Leptospira spp em fêmeas bovinas pertencentes à região de Novo Repartimento - PA", e o título pedido pela banca examinadora é "Pesquisa de Leptospira spp em fêmeas bovinas pertencentes ao município de Novo Repartimento - PA". Gostaria de saber como devo proceder, se há necessidade de mudança no título do projeto que foi a CEUA, reforço que referente as atividades do projeto nada foi alterado."

Comentário da CEUA: "".

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: GUEDES, Israel Barbosa

Título: **Pesquisa de *Leptospira* spp. em fêmeas bovinas pertencentes ao município de Novo Repartimento - Pará**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcos Bryan Heinemann, pelo exemplo de orientador, com competência, compreensão e humildade.

Ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal – VPS da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realizar o curso de Pós-Graduação.

A todos os pesquisadores e funcionários da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pelos ensinamentos, experiências, ajuda e companheirismo.

Ao Laboratório de Zoonoses Bacterianas – LZB, na figura de todos os integrantes, e em especial, à Gisele Oliveira de Souza, incansável na dedicação ao laboratório e ajuda sem hesitação a todos.

À Sheila Oliveira de Souza e Sueli Taniwaki do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia – LABMAS- VPS, pela ajuda nas análises moleculares.

À Médica Veterinária Simone Araújo, pela amizade, e por possibilitar a realização deste trabalho, junto aos funcionários do matadouro.

Aos meus pais, meus irmãos e minha família que sempre me apoiam, independente das minhas decisões e atitudes, são pilares de sustentação para a minha felicidade.

À minha companheira Loíse Lopes, pelo carinho e momentos alegres que me proporciona.

A todos que contribuíram de forma direta e indireta para o sucesso deste trabalho.

OBRIGADO

RESUMO

GUEDES, I. B. **Pesquisa de *Leptospira* spp. em fêmeas bovinas pertencentes ao município de Novo Repartimento - Pará.** [Research of *Leptospira* spp. in cows belonging to the municipality of Novo Repartimento - Pará]. 2017. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

O presente estudo objetivou detectar a infecção por *Leptospira* spp. mediante ensaio sorológico, bacteriológico e molecular em 208 fêmeas bovinas do município de Novo Repartimento e em 58 fetos não abortados destas fêmeas. Em um matadouro municipal da região do Baixo Tocantins - PA foram colhidas amostras de soro sanguíneo, urina e fragmentos dos rins das fêmeas bovinas e amostras de líquidos cavitários, fragmentos dos órgãos e conteúdo gástrico dos fetos. Os testes empregados foram a soroaglutinação microscópica (SAM), o cultivo bacteriológico, a reação em cadeia pela polimerase (PCR) e o sequenciamento de DNA. A frequência de fêmeas bovinas reagentes foi de 65,86% (137/208), com títulos variando de 100 a 3.200, sendo *L. interrogans* sorovar Hardjoprajitno e *L. borgpetersenii* sorovar Hardjobovis os mais prevalentes. Não houve o isolamento de leptospirosas, mas o DNA da bactéria foi detectado em 5,76% (12/208) das amostras de rins e em 14,90% (31/208) das amostras de urina. O sequenciamento de DNA direto dos produtos da PCR foi possível em 30 amostras, distribuídas em quatro espécies diferentes: *L. borgpetersenii* a mais prevalente com 56,70% (17/30), seguida por *L. kirschneri* com 33,30% (10/30), *L. interrogans* com 6,70% (2/30) e *L. santarosai* com 3,30% (1/30). Tanto o genótipo Hardjoprajitno como Hardjobovis foram identificados. Em nenhum dos fetos foi detectado anticorpos anti-*Leptospira* spp. nos líquidos cavitários e nem o DNA da bactéria no pool de órgãos e conteúdo gástrico, mesmo que em alguns fetos foram observadas alterações patológicas macroscópicas sugestivas de leptospirose. Estes resultados inéditos revelam uma diversidade e peculiaridade para a leptospirose bovina em Novo Repartimento, principalmente pela baixa prevalência de *L. santarosai* e mais surpreendente, a presença de *L. kirschneri*, comumente não encontrada em bovinos, diferentemente do que ocorre em outras regiões do país.

Palavras-chave: Pará. Novo Repartimento. leptospirose bovina. sequenciamento.

ABSTRACT

GUEDES, I. B. **Research of *Leptospira* spp. in cows belonging to the municipality of Novo Repartimento – Pará.** [Pesquisa de *Leptospira* spp. em fêmeas bovinas pertencentes ao município de Novo Repartimento – Pará]. 2017. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

The present study aimed to detect the infection by *Leptospira* spp. using serological, bacteriological and molecular assays in 208 bovine females of the municipality of Novo Repartimento and in 58 non-aborted fetuses of these females. At a municipal slaughterhouse in the Baixo Tocantins - PA region were collected samples of blood serum, urine and kidney fragments from bovine females and samples of cavity liquids, fragments of the organs and gastric content of the fetuses. The tests used were microscopic agglutination test (MAT), bacteriological culture, polymerase chain reaction (PCR) and DNA sequencing. The frequency of reactive bovine females was 65.86% (137/208), with titers varying from 100 to 3,200, with *L. interrogans* serovar Hardjoprajitno and *L. borgpetersenii* serovar Hardjobovis the most prevalents. There was no isolation of leptospires, but the DNA of the bacterium was detected in 5.76% (12/208) of the kidney samples and in 14.90% (31/208) of the urine samples. Direct DNA sequencing of PCR products was possible in 30 samples, distributed in four different species: *L. borgpetersenii*, the most prevalent with 56.70% (17/30), followed by *L. kirschneri* with 33.30% (10 / 30), *L. interrogans* with 6.70% (2/30) and *L. santarosai* with 3.30% (1/30). Both genotypes Hardjoprajitno and Hardjobovis were identified. In none of the fetuses was detected antibodies anti-*Leptospira* spp. in the samples of cavity liquids and neither the DNA of the bacterium in the pool of organs and gastric content, although in some fetuses macroscopic pathological changes suggestive of leptospirosis have been observed. These results reveal a diversity and peculiarity for the bovine leptospirosis in Novo Repartimento, mainly due to the low prevalence of *L. santarosai* and more surprising, the presence of *L. kirschneri*, not commonly found in cattle, differently what happens in other regions of country.

Keywords: Pará. Novo Repartimento. bovine leptospirosis. sequencing.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Localização do município de Novo Repartimento no estado do Pará. .27
- Figura 2 - Fluxograma dos ensaios laboratoriais realizados para cada amostra ..30
- Figura 3 - Frequência dos sorovares de *Leptospira* spp. detectados no total de fêmeas bovinas reagentes na SAM pertencentes ao município de Novo Repartimento – PA.37
- Figura 4 - Gel com bandas específicas compatíveis com *Leptospira* spp. (330 pb) detectadas nas amostras de rins das fêmeas bovinas pertencentes ao município de Novo Repartimento - PA. CN: controle negativo, CP: controle positivo. *Ladder* de 100 pb.....38
- Figura 5 - Gel com bandas específicas compatíveis com *Leptospira* spp. (330 pb) detectadas nas amostras de urina das fêmeas bovinas pertencentes ao município de Novo Repartimento - PA. CN: controle negativo, CP: controle positivo. *Ladder* de 100 pb.....39
- Figura 6 - Reconstrução filogenética com as amostras de DNA de *Leptospira* detectadas nas fêmeas bovinas pertencentes ao município de Novo Repartimento – PA. A árvore foi elaborada pelo método de *Neighbor-Joining* com teste de *bootstrap* de 1.000 réplicas, modelo Tamura 3 parâmetros40
- Figura 7 - Reconstrução filogenética com as amostras representativas do grupo *L. kirschneri* >95% identidade para confirmação da espécie de *Leptospira*, nesta análise o gene parcialmente sequenciado foi o *rrs*. A árvore foi elaborada pelo método de *Neighbor-Joining* com teste de *bootstrap* de 1.000 réplicas, modelo Tamura 3 parâmetros42
- Figura 8 - Quantidade de fetos não abortados colhidos no matadouro em relação a idade fetal. Total de 58 animais.....43

Figura 9 - Fígado evidenciando coloração amarelada de um feto não abortado de uma fêmea bovina pertencente ao município de Novo Repartimento - PA.44

Figura 10 - Órgãos edemaciados e hemorrágicos de um feto não abortado de uma fêmea bovina pertencente ao município de Novo Repartimento - PA.44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Especificação e quantidade total de amostras obtidas dos animais. ..28

Tabela 2 - Frequência dos títulos de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em relação ao sorovar mais provável encontrado nas fêmeas bovinas pertencentes ao município de Novo Repartimento - PA.38

Tabela 3 - Identidade encontrada para as amostras de DNA de *Leptospira* detectadas nas fêmeas bovinas pertencentes ao município de Novo Repartimento – PA.....41

Tabela 4 - Distância média entre o grupo *L. kirschneri* >95% identidade em relação aos demais grupos de espécies identificadas. O cálculo foi realizado com o modelo Tamura 3 parâmetros.42

Tabela 5 - Resultados das análises sorológica e molecular em relação às alterações macroscópicas encontradas nos órgãos dos fetos não abortados de fêmeas bovinas pertencentes ao município de Novo Repartimento - PA.....43

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Relação das espécies patogênicas, intermediárias e saprófitas de *Leptospira* spp. atualmente aceitas.....18

Quadro 2 - Antígenos do gênero *Leptospira* empregados no teste de soroaglutinação microscópica (SAM) listados por espécies, com seus respectivos sorogrupos e sorovares.....31

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CN – controle negativo
CP – controle positivo
DNA – ácido desoxirribonucleico
EMJH – Ellighausen, McCullough, Johnson e Harris
EDTA – Ácido Etileno Diamino Tetra-Acético
ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
GT – isotiocianato de guanidina
g – força gravitacional
IgM – imunoglobulina M
IgG – imunoglobulina G
Km - quilômetro
Km² – quilômetro quadrado
LZB – Laboratório de Zoonoses Bacterianas
LABMAS – Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia
LPS – lipopolissacarídeo
mm – índice pluviométrico em milímetro
μL – microlitro
μm - micrometro
mL – mililitro
mM – milimolar
M – molar
min – minuto
pM – pico molar
PCR – reação em cadeia pela polimerase
pH – potencial Hidrogeniônico
p/v – peso/volume
pb – par de bases
qsp – quantidade suficiente para
SAM – soroaglutinação microscópica
s – segundos
STAFF – Sulfametoxazol, Trimetoprim, Anfotericina B, Fosfomicina e 5- Fluorouracil
TE – Tris- EDTA
Tris – HCl – Tris ácido (ácido clorídrico)
TBE – tris borato EDTA
US\$ - Moeda Norte Americana (Dólar)
°C – Grau Celsius
® - registrado
™ – *trade mark*
> - maior
% - porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
3	OBJETIVOS	26
3.1	OBJETIVO GERAL	26
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4	MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1	ÁREA DE ESTUDO	27
4.2	ANIMAIS	28
4.3	COLHEITA DE AMOSTRAS	28
4.3.1	Sangue para obtenção de soro sanguíneo	28
4.3.2	Urina	29
4.3.3	Fragmentos dos rins	29
4.3.4	Amostras fetais	29
4.4	ENSAIOS LABORATORIAIS	30
4.4.1	Sorologia	31
4.4.2	Cultivo bacteriológico	32
4.4.3	Reação em cadeia pela polimerase (PCR)	33
4.4.4	Sequenciamento de DNA	35
4.5	COMPILAÇÃO E ANÁLISE DOS DADOS	36
5	RESULTADOS	37
6	DISCUSSÃO	45
7	CONCLUSÕES	54
	REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma enfermidade de distribuição mundial que acomete diversas espécies de animais, e pelo seu caráter zoonótico, o homem também pode ser infectado, ocasionando impactos para a saúde pública. O agente etiológico da doença são bactérias patogênicas do gênero *Leptospira* que por meio de caracterização sorológica e molecular estão divididas em mais de 260 sorovares.

Nos bovinos a leptospirose manifesta-se principalmente por interferências em âmbito reprodutivo como infertilidade, abortamentos, nascimento de bezeros fracos e natimortalidade, além disso, a diminuição na produção de carne e leite, afetando de modo significativo a pecuária. Uma vez a doença presente em um rebanho, o controle torna-se difícil, principalmente pela adaptação que a bactéria pode apresentar pela espécie, tornando-a reservatório e/ou hospedeiro de manutenção, este é o caso do sorovar Hardjo em bovinos.

A forma mais comum, barata e rápida para avaliar a presença da doença em bovinos é a detecção de anticorpos pelo teste de soroaglutinação microscópica (SAM), pois fornece uma resposta indicativa do possível sorovar infectante. Por muitos anos esta foi a técnica que prevaleceu nos estudos de leptospirose bovina no Brasil e no mundo, sobretudo em trabalhos epidemiológicos, visto que o isolamento da bactéria é difícil, demorado e de baixa sensibilidade. Com o avanço da biologia molecular, foram desenvolvidas técnicas para constatar o DNA da bactéria em diversas amostras biológicas, complementando a sorologia na pesquisa e diagnóstico da leptospirose bovina. Mais recentemente, o sequenciamento de DNA, trouxe uma nova forma de entender tanto o agente quanto a doença, desde sua classificação até a epidemiologia.

A identificação de leptospirosas circulantes em bovinos no Brasil, seja em nível de espécie ou de sorovar, é de extrema relevância, não apenas para elucidar questões epidemiológicas, mas o comportamento destas em relação ao ambiente e hospedeiro, além do mais, possíveis candidatas na elaboração de uma vacina nacional.

O estado do Pará detém o maior rebanho bovino das regiões Norte e Nordeste do Brasil, com aproximadamente 20 milhões de cabeças, contribuindo intensamente para a bovinocultura no país. A atividade é economicamente

importante para o estado, tornando-se essencial na exportação, ficando atrás apenas da exploração de minérios.

Novo Repartimento, município conhecido também por “Princesinha da Transamazônica”, surgiu às margens desta rodovia por meio da extração de madeira, que com o passar dos anos, foi ganhando pecuaristas de médio e grande porte, transformando o município em um grande polo produtor de bovinos do Pará, possuindo atualmente o terceiro maior efetivo do estado e o oitavo do país, com aproximadamente 950.000 cabeças.

Na região Amazônica, as condições climáticas de predominância tropical, com temperaturas elevadas, sendo a média anual de 27°C com uma variação de 1,1°C, umidade e altos índices pluviométricos, em torno de 2.330 mm anuais, favorecem a proliferação da leptospira e o aparecimento de surtos epidêmicos de leptospirose. A heterogeneidade e extensão da região ainda refletem em dificuldades na realização de trabalhos em relação à leptospirose bovina, principalmente no que se refere à pesquisa do agente, seja por isolamento ou detecção molecular.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Leptospiras são bactérias pertencentes ao filo Spirochaetes, classe Spirochaetes, ordem Spirochaetales, família Leptospiraceae e gênero *Leptospira*, sendo em morfologia, espiraladas, flexíveis e delgadas, medindo aproximadamente 0,1 μm de diâmetro e 6 – 20 μm de comprimento. Quando observadas sob microscopia de campo escuro, nota-se a presença de “ganchos” que se formam em uma ou ambas as extremidades da célula, diferenciando-as de outras espiroquetas, além de seu movimento ativo de rotação, conferido pela presença de dois filamentos axiais em sua estrutura. Apesar de não serem coradas pelo método de Gram, possuem uma membrana de lipopolissacarídeos semelhante à de bactérias Gram negativas (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

Em relação ao seu metabolismo, são aeróbias e exigentes em termos nutricionais, geralmente necessitando de ácidos graxos de cadeia longa como fonte de carbono. Apresentam um crescimento ótimo à temperatura de 28 - 30°C e em pH próximo da neutralidade (7,2 - 7,6) (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

Por muitos anos, o gênero *Leptospira* foi classificado em dois grandes grupos: *Leptospira interrogans*, que englobava todas as estirpes patogênicas capazes de causar a doença e *Leptospira biflexa*, contendo as saprófitas de vida livre, esta divisão era baseada em características bioquímicas das bactérias (LEVETT, 2001). Para uma classificação mais específica, por meio da sorologia, as leptospiras foram subdivididas em sorogrupos, levando em consideração a similaridade entre antígenos, e dentro dos sorogrupos, os sorovares, de acordo com a variedade antigênica dos lipopolissacarídeos de membrana, registrando-se 23 sorogrupos com mais de 260 sorovares (ELLIS, 1994; ADLER; MOCTEZUMA, 2010).

Posteriormente, estudos em nível molecular demonstraram que as leptospiras apresentam grande variabilidade genética, possibilitando aprimorar a classificação do gênero, assim, desmembraram-se os dois grupos primários em novas espécies. Atualmente são descritas 10 espécies patogênicas, cinco intermediárias e sete saprófitas (Quadro 1), com contínuo relato de novas espécies, como a mais recente, *Leptospira mayottensis*, isolada de humanos na ilha francesa de Mayotte no Oceano Índico (BOURHY et al., 2014).

Quadro 1 - Relação das espécies patogênicas, intermediárias e saprófitas de *Leptospira* spp. atualmente aceitas.

	Espécie	Referência
Patogênicas	<i>L. alexanderi</i>	BRENNER et al., 1999
	<i>L. alstonii</i>	SMYTHE et al., 2013
	<i>L. borgpetersenii</i>	YASUDA et al., 1987
	<i>L. interrogans</i>	STIMSON, 1907; WENYON 1926
	<i>L. kirschneri</i>	RAMADASS et al., 1992
	<i>L. noguchii</i>	YASUDA et al., 1987
	<i>L. mayottensis</i>	BOURHY et al., 2014
	<i>L. santarosai</i>	YASUDA et al., 1987
	<i>L. terpstrae</i>	SMYTHE et al., 2013
	<i>L. weilii</i>	YASUDA et al., 1987
Intermediárias	<i>L. broomii</i>	LEVETT et al., 2006
	<i>L. fainei</i>	PEROLAT et al., 1998
	<i>L. inadai</i>	YASUDA et al., 1987
	<i>L. licerasiae</i>	MATTHIAS et al., 2009
	<i>L. wolffii</i>	SLACK et al., 2008
Saprófitas	<i>L. biflexa</i>	WOLBACH; BINGER, 1914; NOGUCHI, 1918
	<i>L. meyeri</i>	YASUDA et al., 1987
	<i>L. idonii</i>	SAITO et al., 2013
	<i>L. kmetyi</i>	SLACK et al., 2009
	<i>L. vanthielii</i>	SMYTHE et al., 2013
	<i>L. wolbachii</i>	YASUDA et al., 1987
	<i>L. yanagawae</i>	SMYTHE et al., 2013

Fonte: Elaborado pelo autor.

Esta taxonomia quando associada à classificação tradicional sorológica, exibe certa confusão, especialmente porque um mesmo sorogrupo pode estar presente em mais de uma espécie genômica (BRENNER et al., 1999), a exemplo, o sorogrupo Sejroe, que representa concomitantemente as espécies *L. borgpetersenii*, *L. interrogans* e *L. santarosai*. Apesar desta nova forma de classificar as leptospiros, a classificação baseada em sorogrupos e sorovares ainda é bastante utilizada, sobretudo em estudos epidemiológicos (BHARTI et al., 2003).

Os sorovares de *Leptospira* parecem ter predileção por uma determinada espécie, mas podem infectar uma grande variedade de animais domésticos e silvestres. Os bovinos são considerados hospedeiros naturais do sorovar Hardjo, e

se comportam como reservatórios deste sorovar, favorecendo a persistência da doença dentro de um rebanho (ELLIS, 1994; MOREIRA, 1994); contudo, o sorvar Hardjo também é relatado em outras espécies, como em ovinos (HERMANN et al., 2004), cães (LEMOS et al., 2010), equinos (HASHIMOTO et al., 2010), suínos (OSAVA et al., 2010) e em cachorro do mato (*Cerdocyon thous*) (VIEIRA, 2009).

Os bovinos também podem se infectar com vários sorovares não adaptados, principalmente Pomona, Canicola, Icterohaemorrhagiae e Grippotyphosa que possuem outras espécies como reservatórios (RADOSTITS et al., 2002). Este fato pode ocorrer quando há o contato entre diferentes espécies, promovendo a transmissão da bactéria para hospedeiros acidentais, inclusive o homem, tornando o ciclo da doença complexo e dinâmico (HARTSKEERL et al., 2011).

O sorovar Hardjo é visto como o mais patogênico para os bovinos e apresenta duas estirpes geneticamente distintas, Hardjoprajitno pertence à espécie *Leptospira interrogans* e Hardjobovis à *Leptospira borgpetersenii* (ELLIS, 1994), sendo a primeira espécie mais resistente no ambiente do que a segunda, que parece depender do hospedeiro para sobrevivência (BULACH et al., 2006). Apesar da presença de anticorpos contra a sorovariedade Hardjoprajitno ser relatada com mais frequência nos estudos epidemiológicos no Brasil (FAVERO et al., 2001), ambas estirpes já foram isoladas de bovinos no país (MORAIS, 1994; CHIARELI et al., 2012; CHIDEROLI et al., 2016).

Ultimamente, a identificação em nível de espécie, baseada no DNA, permitiu uma nova abordagem epidemiológica da leptospirose bovina, que antes se restringia a sorologia com um número limitado de sorovares e sorogrupos. Espécies como *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. interrogans*, *L. noguchii* e *L. kirschneri* são encontradas com mais frequência em bovinos (CARMONA-GASCA et al., 2011; HAMOND et al., 2015a; LOUREIRO et al., 2016), mas também, há relatos da presença de *L. weilii* (SMYTHE et al., 2007), *L. licerasiae* (MOMTAZ; MOSHKELANI, 2012) e *L. alstonii* (PINTO et al., 2017), as quais geralmente não possuem sorovares representantes no diagnóstico sorológico.

A transmissão de *Leptospira* spp. pode ocorrer de forma direta por meio da exposição à urina contaminada, produtos de abortamento ou leite (HAIRGROVE, 2004). A via reprodutiva também é importante na transmissão do agente, seja por monta natural ou inseminação artificial (FAINE et al., 1999), visto que no sêmen de touros infectados já foi constatada a presença da bactéria (HEINEMANN et al., 1999;

MAGAJEVSKI et al., 2005), e mesmo com o processo de industrialização, alguns fatores como a adição do glicerol e a criopreservação, permitem a conservação da bactéria (RADOSTITS et al., 2002).

A água tem uma função relevante na transmissão da leptospira, pois quando contaminada com a urina de animais infectados, carrega e mantém o microrganismo viável por longos períodos (LANGONI, 1999; ACHA; SZYFRES, 2003), isto configura-se como importante fator de risco em áreas tropicais que sofrem com alagamentos e enchentes, facilitando a dispersão da bactéria no ambiente. A presença de pastos alagados pode ter relação como fator de risco associado a propriedades com bovinos reagentes para leptospirose (PIMENTA et al., 2014).

As leptospiplas penetram no hospedeiro por meio de pequenas lesões ou abrasões, membranas mucosas e conjuntivas, mas também pela pele íntegra, quando há dilatação dos poros devido a permanência por muito tempo na água (FAINE et al., 1999; VASCONCELLOS, 2004). Por causa de sua motilidade, atingem rapidamente a via linfática e corrente sanguínea, onde passam a se multiplicar, fase da doença conhecida como leptospiremia, momento no qual é possível a detecção do agente no soro sanguíneo e sangue (DEHKORDI et al., 2011; KHAMESIPOUR et al., 2014). Logo, a bactéria dissemina-se para qualquer órgão, como pulmões, fígado, baço, musculatura esquelética e especialmente os rins (ELLIS, 1994; FAINE et al., 1999).

A colonização renal ocorre principalmente nos túbulos contorcidos proximais, onde algumas lipoproteínas e endotoxinas da leptospira provocam lesões significativas, como nefrite intersticial, necrose tubular e até hemorragias, devido ao depósito de imunocomplexos (FRELLSTEDT; SLOVIS, 2009; DAHER et al., 2010). Em abatedouros, a nefrite é uma das causas essenciais de condenação dos rins (YENER; KELES, 2001; CORRÊA et al., 2013), ocasionando perdas econômicas para a indústria da carne.

Nos rins, as leptospiplas podem permanecer por semanas a anos, sendo excretadas na urina de forma intermitente, determinando a fase crônica da enfermidade denominada de leptospirúria (FAINE et al., 1999). Uma vantagem que a bactéria encontra nos ruminantes é a urina de pH levemente alcalino, que favorece sua sobrevivência por mais tempo em relação a urina ácida, como a dos carnívoros, onde a viabilidade é reduzida (ADLER; MOCTEZUMA, 2010).

O aparelho reprodutor das fêmeas também pode ser alvo do agente, localizando-se nos ovários (CAMARGO et al., 1993), oviduto, útero (ELLIS; THIERMANN, 1986) e fluido vaginal de animais não prenhes (LOUREIRO et al., 2017). Já no útero gravídico, as leptospiros geram uma infecção da placenta, atravessam-na e atingem o feto, provocando a morte do animal e sua eliminação (RADOSTITS et al., 2002), sendo possível a detecção da bactéria em amostras destes abortos (GENOVEZ et al., 1993; LANGONI et al., 1999; RICHTZENHAIN et al., 2002).

Em alguns fetos abortados, macroscopicamente, pode-se notar lesões em alguns órgãos, como fígado de coloração amarelada, friável e com pontos brancos acinzentados (SZEREDI; HAKE, 2006), e quando infectados nos estágios tardios de gestação, são capazes de desenvolver anticorpos (ELLIS, 1994), detectáveis no soro sanguíneo (KIRKBRIDE; JOHNSON, 1989) e líquidos cavitários (MOORE et al., 2003).

Os sinais clínicos descritos são muito variados, indo de animais assintomáticos até animais com doença grave. Em casos agudos, não muito comuns, geralmente causados por sorovares não adaptados, observam-se febre, diarreia, anemia, icterícia, hemoglobinúria, hematúria e congestão pulmonar. Na forma crônica da doença, os problemas reprodutivos são mais expressivos, como infertilidade, abortamentos, natimortalidade e nascimento de bezerros fracos (ELLIS, 1994; FAINE et al., 1999).

Na pecuária de corte, calcula-se um prejuízo de aproximadamente US\$ 78,00 para cada fêmea bovina que não produz um bezerro por ano em decorrência de distúrbios reprodutivos (JUNQUEIRA; ALFIERI, 2006). Animais reagentes na sorologia para o sorovariedade Hardjo, podem apresentar baixo desempenho reprodutivo, ocorrendo tanto em rebanhos de corte (JUNQUEIRA et al., 2006) como em rebanhos leiteiros (MINEIRO et al., 2007).

Em bovinos leiteiros é descrita uma mastite flácida, conhecida como síndrome da queda do leite (milk drop syndrome), que ocorre após a infecção da glândula mamária por *Leptospira* spp. envolvendo o sorovar Hardjo (HIGGINS et al., 1980), e a prevalência aparenta ser maior em multíparas do que em primíparas (GAROUSSI et al., 2017). Nesta síndrome, há acentuada diminuição na produção de leite, o qual demonstra coloração amarelada de consistência similar ao colostro, presença de grumos, sangue e elevada contagem de células somáticas (ELLIS,

1984; FAINE et al., 1999). A eliminação da bactéria pelo leite é descrita por isolamento no período inicial da mastite (THIERMANN, 1982).

Para o diagnóstico da leptospirose bovina, deve-se tentar associar sinais clínicos, epidemiologia e exames laboratoriais quando possível, uma vez que a doença apresenta características muito semelhantes a outras enfermidades reprodutivas, com ênfase para os casos crônicos, que pela ausência de sinais clínicos, podem passar despercebidos.

Um dos métodos de diagnóstico mais antigo e prático é a observação direta do agente em fluidos biológicos pela microscopia de campo escuro, porém, a leitura deve ser realizada por pessoal treinado e experiente, pois, dependendo da amostra, os artefatos podem confundir, gerando resultados falsos positivos (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001). Outras técnicas para observação direta do microrganismo estão disponíveis como a histoquímica, imuno-histoquímica, imunofluorescência direta e colorações especiais (FAINE et al., 1999).

O isolamento da leptospira é considerado definitivo para o diagnóstico e de extrema importância epidemiológica, pois se consegue identificar a qual sorogrupo/sorovar o microrganismo pertence. A grande desvantagem deste método é o longo período de incubação, geralmente meses (THIERMANN, 1984; SHIMABUKURO et al., 2003; ROMERO; YASUDA, 2006; MARTINS et al., 2015), além da necessidade de viabilidade da bactéria nas amostras, o que na maioria das vezes não é possível, interferindo na sensibilidade (GENOVEZ et al., 2001; SCARCELLI et al., 2004).

A fim de se isolar leptospiros de diferentes tipos de amostras, várias técnicas podem ser utilizadas, como a inoculação em animais de laboratório (MAGAJEVSKI et al., 2005), técnica da pipeta pasteur (AZEVEDO et al., 2003), diluição seriada (GONÇALVES et al., 2010) e semeio direto da amostra em meios de cultura enriquecidos, incluindo substâncias que inibem o crescimento de contaminantes, mais comum, o meio líquido EMJH (Ellighausen, McCullough, Johnson e Harris) e meio semissólido de Fletcher acrescidos de 5-Fluorouracil e Ácido Nalidíxico (MIRAGLIA et al., 2009) ou um coquetel de agentes seletivos conhecido como STAFF (Sulfametoxazol, Trimetoprim, Anfotericina B, Fosfomicina e 5- Fluorouracil) (CHAKRABORTY et al., 2011; LOUREIRO et al., 2016; ALBUQUERQUE et al., 2017). A técnica da filtração com membrana de porosidade 0,22 µm é muito empregada para a descontaminação de cultivos (BALAMURUNGAN et al., 2013;

MARTINS et al., 2015; PRAMEELA et al., 2015), embora seja utilizada com sucesso no isolamento primário da bactéria em amostras de urina de animais (SILVA et al., 2015a) e humanos (SILVA et al., 2015b).

A soroaglutinação microscópica (SAM), por ser mais acessível e detectar tanto anticorpos do tipo IgM como IgG, é o teste sorológico mais utilizado no diagnóstico da doença, fornecendo uma resposta indicativa do possível sorogrupo/sorovar infectante. O ensaio é realizado com antígenos vivos de *Leptospira* spp., geralmente incluindo estirpes representativas de cada sorogrupo conhecido em determinada região, aumentando a sensibilidade na detecção de anticorpos (FAINE et al., 1999). Esta sensibilidade pode ser potencializada quando estirpes autóctones isoladas na própria região ou país são inseridas no painel de antígenos empregados no teste (SARMENTO et al., 2012).

A interpretação dos resultados deve ser criteriosa, principalmente quando os animais foram vacinados contra leptospirose, pois os anticorpos gerados pela vacinação podem persistir por meses, dificultando a diferenciação dos títulos vacinais de reações resultantes de infecção (FREUDENSTEIN; HEIN, 1991). Outra situação são as reações cruzadas que podem ocorrer entre alguns sorovares devido à similaridade do LPS, ou seja, um único animal pode ser reagente para mais de uma sorovariedade (BOLIN, 2003), assim, o sorovar mais provável de ser a causa da infecção, é determinado pela maior titulação, sem que ocorra outro sorovar com o mesmo título (VASCONCELLOS et al., 1997).

O Ensaio de imunoabsorção enzimática, de acrônimo ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), também é uma opção no diagnóstico sorológico da leptospirose bovina. Duas formas do teste são descritas: Kits comerciais, frequentemente elaborados com apenas o sorovar Hardjo (RYAN et al., 2012; NGBEDE et al., 2013), e o teste desenvolvido manualmente pelo próprio laboratório, contendo um pool de sorovares (SURUJBALLI; MALLORY, 2004) ou a proteína de membrana LipL 32, restrita às espécies patogênicas de *Leptospira* (BOMFIM, et al., 2005; TOMICH et al., 2007). O ELISA indireto mostra-se como um teste tão sensível quanto a SAM, de maior agilidade e segurança, pois não há manipulação da bactéria viva (RAJAN et al., 2017); apesar disso, pode não ser tão útil em estudos epidemiológicos, já que não ocorre a discriminação de distintos sorovares.

Um diagnóstico mais rápido e preciso pode ser obtido com a detecção do DNA de *Leptospira* spp. mediante a reação em cadeia pela polimerase (PCR), desta

forma, consegue-se identificar animais em estágios iniciais da infecção, quando anticorpos ainda não são detectáveis (WHO, 2003). A PCR permite a detecção de quantidades relativamente pequenas de leptospiros dependendo do material clínico, por exemplo, menos de 10 bactérias/mL em amostras de urina (BAL et al., 1994), chegando a 100 bactérias/mL em sêmen (HEINEMANN et al., 2000), o qual apresenta textura muito mais viscosa que a urina.

Enquanto para o isolamento de leptospiros é indispensável a viabilidade do microrganismo, na PCR, o armazenamento prolongado das amostras parece não interferir na detecção do agente, e ainda, a técnica pode ser feita em somente um dia (VAN EYS et al., 1989). Mesmo com estas vantagens, resultados falsos negativos podem ocorrer devido à natureza da enfermidade, tal como a eliminação intermitente da bactéria pela urina (SCHULLER et al., 2015), não descartando infecção.

O sequenciamento de DNA foi a ferramenta molecular mais recente a ser utilizada para taxonomia das leptospiros (HOOKEY et al., 1993), pois avalia de forma minuciosa o DNA do agente, e assim, também permitiu a primeira análise completa do genoma de uma leptospira, representada pela *L. interrogans* sorovar Lai (REN et al., 2003).

O gene 16S rRNA (*rrs*), codificante da subunidade 16S ribossomal, por ser considerado conservado entre as espiroquetas, é um dos maiores alvos de sequenciamento para caracterização de *Leptospira* spp. (HOOKEY et al., 1993; POSTIC et al., 2000; SHUKLA et al., 2003; MOREY et al., 2006), além disso, a grande quantidade de sequências depositadas em bancos de dados genéticos (GenBank, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) de livre acesso, auxiliam nas análises filogenéticas e de caracterização molecular. Porém, as sequências deste gene podem apresentar significativa homologia entre elas (MOREY et al., 2006), dificultando a diferenciação entre espécies muito relacionadas.

Assim, outros genes passaram a ser estudados como potenciais na identificação de leptospiros, como gene *adk*, *icdA*, LipL32, LipL41 e Sec Y, demonstrando que outros alvos possuem poder discriminatório maior do que o gene *rrs*, como o Sec Y (AHMED et al., 2006). Este gene codifica a principal pré-proteína translocase que integra o complexo proteico SecYEG, e vem sendo empregado no sequenciamento para caracterização de *Leptospira* spp., estando validado de acordo com diretrizes internacionais para fornecer dados à nível filogenético (VICTORIA et

al., 2008; AHMED et al., 2009). Atualmente, o sequenciamento direto dos produtos da PCR obtidos de amostras biológicas, pode ser uma alternativa valiosa na epidemiologia molecular da leptospirose, ainda mais quando o isolamento da bactéria não é possível (PEREZ; GOARANT, 2010; BOURHY et al., 2013; HAMOND et al., 2015a).

Para o controle da leptospirose bovina, a vacinação é uma das medidas preventivas mais importantes (ARDUINO et al., 2009), principalmente em novilhas, que parecem se infectar com o agente ao entrarem em serviço reprodutivo (GENOVEZ et al., 2004). Inúmeras vacinas comerciais estão disponíveis, incluindo em sua composição, de cinco até dez sorovariedades, apontadas por estudos sorológicos como as mais prevalentes em boa parte das regiões do país (CASTRO et al., 2008); todavia, as vacinas conferem proteção específica para os sorovares da formulação, podendo ser um entrave em uma região onde outros sorovares também são prevalentes e não estão contidos nas vacinas comerciais (SALDANHA et al., 2007; TONIN et al., 2010). Uma vacina autógena, elaborada a partir de estirpes isoladas de um rebanho, mostra-se eficaz no controle da doença dentro deste mesmo rebanho (CHIARELI et al., 2012).

Outra medida complementar para o controle é o tratamento dos animais positivos para leptospirose, pois a vacinação não elimina o estado de portador (GIRIO et al., 2005). As condições ambientais também devem ser levadas em consideração, visto que em uma propriedade, o contato dos bovinos com roedores, animais silvestres e aguadas podem dificultar o controle da leptospirose bovina (DEL FAVA et al., 2003).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Evidenciar a infecção por *Leptospira* spp. em fêmeas bovinas criadas em Novo Repartimento, abatidas em um matadouro municipal da região do Baixo Tocantins - PA, e em fetos não abortados destas fêmeas colhidos no mesmo matadouro.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar anticorpos anti-*Leptospira* spp., por meio da técnica de soroprecipitação microscópica (SAM), no soro sanguíneo das fêmeas e nos líquidos cavitários dos fetos;
- Identificar o(s) sorovar(es) prevalente(s) no município;
- Isolar leptospiros através do cultivo bacteriológico de urina das fêmeas abatidas;
- Detectar o DNA de *Leptospira* spp., aplicando a reação em cadeia pela polimerase (PCR), em rins e urina das fêmeas abatidas, nos órgãos e conteúdo gástrico dos fetos;
- Determinar as espécies de *Leptospira* utilizando o sequenciamento de DNA das amostras positivas no cultivo bacteriológico e na PCR.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ÁREA DE ESTUDO

O município de Novo Repartimento localiza-se na mesorregião Sudeste do Pará a uma distância de 511 Km da capital Belém (Figura 1). Possui uma área territorial de 15.398,722 Km² (IBGE, 2016) e está delimitado pelos municípios de Pacajá, Tucuruí, Goianésia do Pará, Jacundá, Anapu, Marabá e Itupiranga. Em 2016 a população estimada foi de 72.347 pessoas (IBGE, 2016).

O Clima na região é do tipo tropical úmido com temperaturas elevadas, tendo a média anual de 27°C e precipitações durante o ano todo, com um volume anual de 2.330 mm, além de uma vegetação tropical que abriga uma vasta diversidade de espécies vegetais e animais.

A pecuária no município caracteriza-se expressivamente pela criação extensiva de gado de corte.

Figura 1 – Localização do município de Novo Repartimento no estado do Pará.

Fonte: Arquivo pessoal.

4.2 ANIMAIS

Foram escolhidas, de forma aleatória, 208 fêmeas bovinas, abatidas em um matadouro da região do Baixo Tocantins – Pará, com supervisão do Serviço de Inspeção Municipal. Os animais eram mestiços, mas com características fenotípicas mais próximas das raças zebuínas, idade acima de 36 meses, aptidão para corte e sem registros de vacinação contra leptospirose, além de histórico reprodutivo desconhecido.

No abate destes animais, dentre as que estavam prenhes, foram colhidos, também aleatoriamente, 58 fetos em diferentes períodos de gestação, assim, para a determinação da idade fetal, utilizou-se o parâmetro de mensuração da distância atlanto-sacral de acordo com Barr et al. (1990).

4.3 COLHEITA DE AMOSTRAS

Todas as amostras (Tabela 1) foram colhidas durante a linha de abate dos animais.

Tabela 1 - Especificação e quantidade total de amostras obtidas dos animais.

Matriz	Amostra	Quantidade
Fêmea bovina	Sangue	208
	Urina	208
	Fragmentos dos rins	208
Feto	Líquidos cavitários	58
	Fragmentos de órgãos	58
	Conteúdo gástrico	58

4.3.1 Sangue para obtenção do soro sanguíneo

Após a abertura sagital da barbela e antes da sangria, o sangue foi colhido por venopunção da jugular com auxílio de seringa e agulha estéreis, transferido para tubos de ensaio desprovidos de anticoagulantes mantidos em posição inclinada, à temperatura ambiente, até a obtenção do soro sanguíneo, o qual foi aliquotado em

microtubo de 1,5 mL identificado e armazenado a -20°C até o momento de realização dos ensaios laboratoriais.

4.3.2 Urina

No momento de abertura da cavidade abdominal para evisceração, a bexiga foi puncionada com agulha acoplada a seringa estéril para colheita da urina, cerca de 10 mL. Uma alíquota de 1,0 mL foi transferida para um microtubo de 1,5 mL identificado e armazenada a -20°C, para posterior realização da análise molecular, o volume restante (9 mL) foi submetido ao cultivo bacteriológico.

4.3.3 Fragmentos dos rins

Na sala de vísceras, após a limpeza e abertura dos órgãos para inspeção, pequenos fragmentos de ambos os rins foram colhidos, de forma a conter as regiões medular e cortical do órgão. Os fragmentos foram armazenados em sacos plásticos estéreis com fecho identificados, mantidos a -20°C até a realização dos ensaios laboratoriais.

4.3.4 Amostras fetais

Os fetos foram necropsiados no próprio matadouro e durante o procedimento, foram registradas, quando presentes, alterações patológicas macroscópicas nos órgãos como: coloração amarelada (icterícia), hemorragia, edema e/ou consistência friável.

Os líquidos torácico, abdominal e/ou pericárdico foram colhidos com seringas estéreis e unidos em um microtubo de 1,5 mL identificado, gerando um pool de líquidos cavitários para cada feto.

Pequenos fragmentos de pulmão, fígado, baço e rim, de cada feto, foram colhidos com auxílio pinças e tesouras cirúrgica estéreis e armazenados em sacos plásticos estéreis com fecho identificados, gerando um pool de órgãos. O conteúdo

gástrico dos fetos foi colhido por punção e armazenado em microtubo de 1,5 mL identificado.

Todas as amostras dos fetos foram mantidas a -20°C até a realização dos ensaios laboratoriais.

4.4 ENSAIOS LABORATORIAIS

As amostras foram encaminhadas e processadas no Laboratório de Zoonoses Bacterianas (LZB) e no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia (LABMAS), ambos integrantes do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. A Figura 2 mostra o fluxograma dos ensaios que as amostras foram submetidas.

Figura 2 – Fluxograma dos ensaios laboratoriais realizados para cada amostra.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4.1 Sorologia

Para pesquisa de anticorpos contra *Leptospira* spp. empregou-se o teste de soroaglutinação microscópica (SAM), de acordo com Galton et al. (1965) e Cole et al. (1973), aplicando-se uma coleção de 24 antígenos vivos, entre amostras de referência e estirpes autóctones isoladas no Brasil (Quadro 2).

Quadro 2 - Antígenos do gênero *Leptospira* empregados no teste de soroaglutinação microscópica (SAM) listados por espécies, com seus respectivos sorogrupos e sorovares.

Espécie	Sorogrupo	Sorovar
<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Castellonis
	Sejroe	Hardjo (Hardjobovis)
	Javanica	Javanica
	Tarassovi	Tarassovi
	Celledoni	Whitcombi
<i>L. interrogans</i>	Australis	Australis
	Autumnalis	Autumnalis
	Bataviae	Bataviae
	Australis	Bratislava
	Canicola	Canicola
	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni
	Sejroe	Hardjo (Hardjoprajitno)
	Hebdomadis	Hebdomadis
	Pomona	Pomona
	Pomona	Pomona (GR6)
	Pyrogenes	Pyrogenes
	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae
	Djasiman	Sentot
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa
	Autumnalis	Butembo
	Cynopteri	Cynopteri
<i>L. noguchi</i>	Panama	Panama
<i>L. santarosai</i>	Shermani	Shermani
	Sejroe	Guaricura

Fonte: Baseado nos antígenos utilizados na rotina de diagnóstico sorológico de leptospirose em animais realizado pelo laboratório (LZB).

As amostras de soro sanguíneo das fêmeas foram processadas diretamente, entretanto, o pool de líquidos cavitários dos fetos foi centrifugado a 1.800 x g por 10 min e o sobrenadante foi utilizado na técnica.

O soro sanguíneo das fêmeas bovinas foi diluído na proporção 1:50 em solução salina de Sørensen (pH 7,4) e o pool de líquidos cavitários dos fetos, diluído na proporção de 1:5 na mesma solução mencionada anteriormente. Em seguida, 50 µL das diluições das amostras foi depositado em microplacas de poliestireno contendo 96 poços, posteriormente, 50 µL do antígeno foi adicionado aos poços, atingindo-se a diluição 1:100 para o soro sanguíneo das fêmeas bovinas e 1:10 para o pool de líquidos cavitários dos fetos (triagem). As microplacas foram incubadas a 28°C por no mínimo duas horas para realização da leitura e interpretação. Como controle para validação do teste, cada antígeno foi analisado microscopicamente quanto a sua viabilidade, pureza e auto aglutinação.

A leitura foi realizada por meio de microscopia de campo escuro para observação de aglutinações, sendo consideradas reagentes apenas aquelas amostras que apresentaram no mínimo 50% de leptospiros aglutinadas na diluição 1:100.

As amostras reagentes na triagem foram novamente testadas para definir o título final de aglutinação. Para a titulação, as amostras foram diluídas de forma seriada na razão dois em solução salina de Sørensen (pH 7,4) e acrescentado 50 µL do antígeno que foi reagente na triagem. A incubação das microplacas e leitura do teste decorreram como descrito anteriormente, considerando como título final a recíproca maior diluição da amostra em que se observou 50% ou mais de leptospiros aglutinadas.

4.4.2 Cultivo bacteriológico

O processamento da urina para o cultivo bacteriológico foi realizado no próprio matadouro, instantes após a colheita da urina, visando reduzir a perda de células viáveis e uma maior recuperação de leptospiros.

O método empregado foi adaptado de Silva et al. (2015)a, onde a urina foi levemente homogeneizada e, em condições de assepsia, um filtro de membrana 0,22 µm descartável foi acoplado na mesma seringa para filtração; três a cinco gotas

da urina filtrada foi semeada diretamente em tubos de ensaio, contendo meio líquido de EMJH (Ellighausen, McCullough, Johnson e Harris) enriquecido com soro de coelho 10% e desprovido de mistura antibiótica.

As amostras semeadas foram incubadas em estufa bacteriológica a aproximadamente 28°C, sendo examinadas semanalmente quanto à turbidez do meio e em caso de cultivos suspeitos, a confirmação por microscopia de campo escuro, na observação de formas bacterianas compatíveis com leptospiros: células delgadas, espiraladas, com “ganchos” nas extremidades e motilidade.

Após o período de 20 semanas de incubação, todos os cultivos foram observados individualmente sob microscopia de campo escuro, e considerados negativos na ausência de leptospiros.

4.4.3 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

Inicialmente os fragmentos de rins das fêmeas e o pool de órgãos fetais foram macerados em 10% (p/v) em tampão TE (10 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, pH 8,0) e 200 µL aliquoteados em microtubos estéreis livres de DNase e RNase. As amostras de urina foram centrifugadas a 12.000 x g por 10 min, o sobrenadante foi descartado e o sedimento suspenso em 200 µL tampão TE. O conteúdo gástrico foi processado diretamente.

A extração e purificação do DNA das amostras foram realizadas utilizando-se o isotiocianato de guanidina – GT (adaptado de CHOMCKZYNSKI, 1993), para isso, 450 µL de GT (30 g de isotiocianato de guanidina; 2,5 mL de Tris-HCl 1 M pH 7,5; 5 mL de EDTA 0,25 M pH 8,0; 50 mL de fenol; água ultrapura qsp 100 mL) foi adicionado aos 200 µL das amostras (macerados, urina e conteúdo gástrico), homogeneizadas vigorosamente em agitador de tubos tipo vórtex e incubadas a temperatura ambiente (aproximadamente 22°C) por 10 min, após este período, foi adicionado 100 µL de clorofórmio e homogeneizadas novamente. As amostras foram centrifugadas a 12.000 x g durante 10 min a 4°C. Em seguida, 200 µL do sobrenadante foi transferido para um novo microtubo acrescido de 200 µL de propanol, homogeneizado por inversão e incubado por um período de no mínimo duas horas a -20°C. Após este período as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g durante 30 min a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com

900 µL de etanol 70%, centrifugado a 12.000 x g durante 10 min a 4°C e o sobrenadante foi novamente eliminado. O sedimento foi seco em placa aquecida sem agitação a 56°C por 10 min, após, foram suspensos em 30 µL de TE e novamente incubados em placa aquecida a 56°C por 10 min. O material extraído foi armazenado a -20°C até o momento de uso.

Foram realizadas duas reações separadamente, a primeira aplicada à todas as amostras para a detecção do DNA da bactéria (fragmentos de rins e urina das fêmeas bovinas; pool de órgãos e conteúdo gástrico dos fetos), e a segunda, apenas para as amostras positivas na primeira reação.

A amplificação do DNA para *Leptospira* spp. foi realizada empregando-se a Go Taq™ Green Master Mix (Promega Brasil), seguindo as instruções do fabricante.

Na primeira reação, os pares de *primers* utilizados foram de acordo com Mérien et al. (1992), Lep1 (5'-GGCGGCGCGTCTTAAACATG-3') e Lep2 (5'-TTCCCCCATTTGAGCAAGATT-3') que amplificam a região de 330 pb do gene 16S rRNA (*rrs*). As amostras foram submetidas a uma desnaturação inicial de cinco min a 94°C, 40 ciclos de 94°C por 30 s, 60°C por 30 s, 72°C por 30 s e extensão final 72°C por cinco min. Como controle positivo para esta reação foi empregada *L. interrogans* sorovar Hardjoprajitno e como controle negativo água ultrapura.

Na segunda reação, os pares de *primers* utilizados foram de acordo com Ahmed et al. (2006), F (5'-ATGCCGATCATTTTTGCTTC-3') e R (5'-CCGTCCCTTAATTTTAGACTTCTTC-3') que amplificam a região de 549 pb do gene *sec Y*. As amostras foram submetidas a uma desnaturação inicial de três min a 94°C, 35 ciclos de 94°C por 30 s, 55°C por 30 s, 72°C por 45 s e extensão final 72°C por cinco min. Os controles positivo e negativo foram os mesmos utilizados na reação anterior.

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v), com tampão de corrida TBE 0,5X (0,045 M de Tris-borato, 1 mM de EDTA, pH 8,0). O gel foi corado com SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen®) e posteriormente fotografado sob luz ultravioleta com o auxílio de um transiluminador.

4.4.4 Sequenciamento de DNA

O produto amplificado com banda única, revelada no gel de agarose, foi diretamente purificado com uma reação de 5 µL deste produto e 2 µL *ExoSap-IT* (Affymetrix), submetida a 37°C por 15 min e posteriormente a 80°C por 15 min. Quando houve a presença de bandas inespecíficas no gel de agarose, a banda desejada foi cortada e purificada através do *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit* (GE Healthcare), seguindo as instruções do fabricante.

As amostras purificadas foram submetidas a reação de sequenciamento pelo método de Sanger mediante *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Life Technologies®). Para a reação final de 10 µL de volume, foram utilizados 1 µL de *Big Dye*, 1,5 µL de *buffer* 5X, 0,5 µL de *primer* (10 pM) e 7 µL do DNA alvo purificado. A condição para a reação seguiu com temperatura inicial de desnaturação de 96°C por 1 min, 40 ciclos de 96°C por 10 s; 50°C por 5 s; e 60°C por 4 min.

Cada produto foi sequenciado pelo menos com duas réplicas, sendo uma com o *primer* senso e outra com o anti-senso, aumentando a confiabilidade dos resultados.

O produto gerado foi precipitado com etanol/EDTA, onde foi aplicado 2,5 µL de EDTA 125 mM e 30 µL de Etanol 100%, incubado em seguida, por 15 min à temperatura ambiente. Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 2.250 x g por 30 min a 15°C. Imediatamente após, uma centrifugação a 180 x g por 1 min com placa invertida foi realizada, logo, 30 µL de etanol 70% foi adicionado seguido de centrifugação a 1.650 x g por 15 min a 15°C. Uma nova centrifugação com a placa invertida foi realizada a 180 x g por 1 min, em seguida a placa foi seca no termociclador aberto a 95°C por 10 min. Finalmente foi adicionado 10 µL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems®) e a desnaturação realizada a 95°C por 2 min e 4°C por mais 2 min.

A eletroforese de sequenciamento foi realizada pelo sequenciador automático modelo ABI-3500 (Applied Biosystems®).

Os cromatogramas gerados pelo sequenciador para cada uma das sequências (senso e anti-senso) foram submetidos ao aplicativo Phred (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>) para avaliação da qualidade dos mesmos, e em seguida submetidos ao BLASTn

(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) para uma confirmação inicial do gênero *Leptospira*.

Toda a análise de bioinformática foi realizada com o auxílio dos programas BioEdit Sequence Alignment Editor e MEGA versão 7.

As sequências finais editadas foram comparadas com sequências homólogas disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

A reconstrução filogenética foi elaborada a partir da matriz de alinhamento pelo método de *Neighbor-Joining* com teste de *bootstrap* de 1.000 réplicas, modelo Tamura 3 parâmetros.

4.5 COMPILAÇÃO E ANÁLISE DOS DADOS

Todos os dados gerados foram sumarizados, organizados e analisados através da estatística descritiva por meio de medidas de frequência.

A determinação do sorovar mais provável foi realizada pela técnica de ranqueamento, sendo que o animal reagente para mais de um sorovar com título predominante igual, foi desconsiderado para esta análise (VASCONCELLOS et al., 1997).

5 RESULTADOS

Do total de 208 amostras de soro sanguíneo das fêmeas bovinas, 137 (65,86%) foram reagentes na SAM para no mínimo um dos 24 sorovares de *Leptospira* spp. utilizados (Figura 3) com títulos variando de 100 a 3.200.

Figura 3 – Frequência dos sorovares de *Leptospira* spp. detectados no total de fêmeas bovinas reagentes na SAM pertencentes ao município de Novo Repartimento – PA.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Avaliando-se pelo sorovar mais provável, do total de 208 amostras de soro sanguíneo das fêmeas bovinas, 97 (46,63%) foram reagentes e 111 (53,36%) não reagentes, com títulos variando de 100 a 3.200 para 13 dos 24 sorovares testados (Tabela 2).

Tabela 2 - Frequência dos títulos de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em relação ao sorovar mais provável encontrado nas fêmeas bovinas pertencentes ao município de Novo Repartimento - PA.

Sorovares	Títulos						Total	Total (%)
	100	200	400	800	1.600	3.200		
Hardjoprajitno	1	4	13	13	-	3	34	35,05
Hardjobovis	2	15	8	2	1	-	28	28,86
Shermani	3	4	2	-	1	-	10	10,30
Canicola	-	-	3	1	2	-	6	6,18
Tarassovi	2	1	1	-	-	-	4	4,12
Grippotyphosa	-	2	-	1	-	-	3	3,09
Bratislava	1	1	1	-	-	-	3	3,09
Pomona (GR6)	2	-	-	1	-	-	3	3,09
Butembo	1	1	-	-	-	-	2	2,01
Guaricura	-	-	-	1	-	-	1	1,03
Copenhageni	-	1	-	-	-	-	1	1,03
Whitcombi	-	1	-	-	-	-	1	1,03
Javanica	1	-	-	-	-	-	1	1,03

Nenhuma das 208 amostras de urina submetidas ao cultivo bacteriológico foi positiva.

Na primeira PCR (gene *rrs*), foi detectado o DNA de *Leptospira* spp. em 5,76% (12/208) das amostras de rins e em 14,90% (31/208) das amostras de urina (Figuras 4 e 5). Assim, 35 fêmeas bovinas foram positivas, visto que em oito animais houve a detecção simultânea do DNA nas amostras de rim e urina.

Figura 4 - Gel com bandas específicas compatíveis com *Leptospira* spp. (330 pb) detectadas nas amostras de rins das fêmeas bovinas pertencentes ao município de Novo Repartimento - PA. CN: controle negativo, CP: controle positivo. Ladder de 100 pb.

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 5 - Gel com bandas específicas compatíveis com *Leptospira* spp. (330 pb) detectadas nas amostras de urina das fêmeas bovinas pertencentes ao município de Novo Repartimento - PA. CN: controle negativo, CP: controle positivo. Ladder de 100 pb.

Fonte: Arquivo pessoal.

Na segunda PCR (gene *sec Y*), realizada apenas com as amostras positivas na primeira PCR (gene *rrs*), revelou um total de 30 amostras positivas, sendo 25% (3 / 12) das amostras de rim e 87,09% (27 / 31) das amostras de urina.

A partir das amostras positivas na segunda PCR, foi realizado o sequenciamento parcial do gene *sec Y*, gerando 100% de sequências interpretáveis.

As sequências foram agrupadas em quatro clados de espécies diferentes (Figura 6), 56,70% (17/30) foram identificadas como *L. borgpetersenii*; 3,30% (1/30) como *L. santarosai*; 6,70% (2/30) como *L. interrogans*, e 33,30% (10/30) como *L. kirschneri*, sendo que quatro sequências agruparam com *L. kirschneri* sorovar Galtoni (EU358025) e seis agruparam em um clado independente. A identidade encontrada para as espécies variou de >95% a 100%. As demais amostras que foram negativas na PCR (gene *sec Y*) (13/43) tiveram o sequenciamento parcial do gene *rrs*, para a confirmação do gênero *Leptospira* (Tabela 3).

Figura 6 – Reconstrução filogenética com as amostras de DNA de *Leptospira* detectadas nas fêmeas bovinas pertencentes ao município de Novo Repartimento – PA. A árvore foi elaborada pelo método de *Neighbor-Joining* com teste de *bootstrap* de 1.000 réplicas, modelo Tamura 3 parâmetros.

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 3 - Identidade encontrada para as amostras de DNA de *Leptospira* detectadas nas fêmeas bovinas pertencentes ao município de Novo Repartimento – PA.

Amostra	Gene sequenciado ¹	Identidade	Espécie
36 rim	<i>rrs</i>	100%	<i>Leptospira</i> sp.
60 rim	<i>rrs</i>	100%	<i>Leptospira</i> sp.
63 rim	<i>rrs</i>	100%	<i>Leptospira</i> sp.
98 rim	<i>rrs</i>	100%	<i>Leptospira</i> sp.
102 rim	<i>rrs</i>	100%	<i>Leptospira</i> sp.
136 rim	<i>rrs</i>	100%	<i>Leptospira</i> sp.
169 rim	<i>rrs</i>	100%	<i>Leptospira</i> sp.
172 rim	<i>rrs</i>	100%	<i>Leptospira</i> sp.
188 rim	<i>rrs</i>	100%	<i>Leptospira</i> sp.
10 urina	<i>rrs</i>	100%	<i>Leptospira</i> sp.
43 urina	<i>rrs</i>	100%	<i>Leptospira</i> sp.
51 urina	<i>rrs</i>	100%	<i>Leptospira</i> sp.
62 urina	<i>rrs</i>	100%	<i>Leptospira</i> sp.
119 rim	Sec Y	>99%	<i>L. borgpetersenii</i>
119 urina	Sec Y	>99%	<i>L. borgpetersenii</i>
128 rim	Sec Y	>99%	<i>L. borgpetersenii</i>
128 urina	Sec Y	>99%	<i>L. borgpetersenii</i>
172 urina	Sec Y	>99%	<i>L. borgpetersenii</i>
33 urina	Sec Y	>99%	<i>L. borgpetersenii</i>
49 urina	Sec Y	>99%	<i>L. borgpetersenii</i>
112 urina	Sec Y	>99%	<i>L. borgpetersenii</i>
130 urina	Sec Y	>99%	<i>L. borgpetersenii</i>
138 urina	Sec Y	>99%	<i>L. borgpetersenii</i>
139 urina	Sec Y	>99%	<i>L. borgpetersenii</i>
169 urina	Sec Y	>99%	<i>L. borgpetersenii</i>
35 urina	Sec Y	100%	<i>L. borgpetersenii</i>
63 urina	Sec Y	100%	<i>L. borgpetersenii</i>
24 urina	Sec Y	>97%	<i>L. borgpetersenii</i>
106 urina	Sec Y	>97%	<i>L. borgpetersenii</i>
208 urina	Sec Y	>98%	<i>L. borgpetersenii</i>
61 urina	Sec Y	>98%	<i>L. santarosai</i>
161 rim	Sec Y	100%	<i>L. interrogans</i>
98 urina	Sec Y	100%	<i>L. interrogans</i>
157 urina	Sec Y	>95%	<i>L. kirschneri</i>
188 urina	Sec Y	>95%	<i>L. kirschneri</i>
140 urina	Sec Y	>95%	<i>L. kirschneri</i>
105 urina	Sec Y	>95%	<i>L. kirschneri</i>
67 urina	Sec Y	>95%	<i>L. kirschneri</i>
30 urina	Sec Y	>95%	<i>L. kirschneri</i>
42 urina	Sec Y	100%	<i>L. kirschneri</i>
60 urina	Sec Y	100%	<i>L. kirschneri</i>
120 urina	Sec Y	100%	<i>L. kirschneri</i>
177 urina	Sec Y	100%	<i>L. kirschneri</i>

Legenda: ¹Sequenciamento parcial.

O grupo de amostras: 157 urina, 188 urina, 140 urina, 105 urina, 67 urina e 30 urina obteve identidade mais próxima à *L. kirschneri* (>95%), entretanto, uma identidade de 95% para *Leptospira* pode ser considerada baixa para identificação à nível de espécie, então para confirmação, as amostras foram agregadas em um novo grupo (*L. kirschneri* >95% identidade) e a distância média entre os outros

grupos de espécies foi calculada, mostrando que o grupo tem a menor distância para *L. kirschneri*. (Tabela 4)

Tabela 4 – Distância média entre o grupo *L. kirschneri* >95% identidade em relação aos demais grupos de espécies identificadas. O cálculo foi realizado com o modelo Tamura 3 parâmetros.

Grupos	<i>L. kirschneri</i> >95% ident.
<i>L. kirschneri</i> >95% ident.	0,000
<i>L. kirschneri</i>	0,052
<i>L. borgpetersenii</i>	0,222
<i>L. interrogans</i>	0,095
<i>L. santarosai</i>	0,209
<i>L. noguchii</i>	0,101
<i>L. biflexa</i>	0,358

Para a confirmação definitiva deste grupo, 3 amostras (140 urina, 157 urina e 105 urina) foram selecionadas e submetidas ao sequenciamento parcial do gene *rrs*. A identidade encontrada foi de >98% para *L. kirschneri* e a árvore filogenética mostra a proximidade com o clado formado por *L. kirschneri* (Figura 7).

Figura 7 – Reconstrução filogenética com as amostras representativas do grupo *L. kirschneri* >95% identidade para confirmação da espécie de *Leptospira*, nesta análise o gene parcialmente sequenciado foi o *rrs*. A árvore foi elaborada pelo método de *Neighbor-Joining* com teste de *bootstrap* de 1.000 réplicas, modelo Tamura 3 parâmetros.

Fonte: Arquivo pessoal.

Em relação às análises realizadas nas amostras dos fetos, não foi possível associar os resultados encontrados com de suas respectivas mães. Grande parte dos fetos estava no segundo e terceiro trimestre de gestação (Figura 8.). Nenhum dos 58 fetos foi reagente na sorologia e nem o DNA de *Leptospira* spp. foi detectado no pool de órgãos e conteúdo gástrico dos animais; porém, em 10 animais foram observadas alterações patológicas macroscópicas em órgãos (Tabela 5, Figura 9 e Figura 10).

Figura 8 – Quantidade de fetos não abortados colhidos no matadouro em relação a idade fetal. Total de 58 animais.

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 5 - Resultados das análises sorológica e molecular em relação às alterações macroscópicas encontradas nos órgãos dos fetos não abortados de fêmeas bovinas pertencentes ao município de Novo Repartimento - PA.

Feto	Idade fetal	Alterações encontradas	Sorologia (SAM)	PCR pool de órgãos	PCR conteúdo gástrico
3	8 meses	Fígado amarelado	Não Reagente	Negativo	Negativo
6	8 meses	Fígado amarelado	Não Reagente	Negativo	Negativo
12	7 meses	Fígado amarelado	Não Reagente	Negativo	Negativo
22	6 meses	Fígado amarelado	Não Reagente	Negativo	Negativo
31	5 meses	Órgãos edemaciados e hemorrágicos	Não Reagente	Negativo	Negativo
34	5 meses	Fígado friável com pontos hemorrágicos	Não Reagente	Negativo	Negativo
44	6 meses	Fígado amarelado	Não Reagente	Negativo	Negativo
47	8 meses	Fígado amarelado	Não Reagente	Negativo	Negativo
49	8 meses	Fígado amarelado	Não Reagente	Negativo	Negativo
58	7 meses	Fígado amarelado	Não Reagente	Negativo	Negativo

Figura 9 - Fígado evidenciando coloração amarelada de um feto não abortado de uma fêmea bovina pertencente ao município de Novo Repartimento - PA.

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 10 - Órgãos edemaciados e hemorrágicos de um feto não abortado de uma fêmea bovina pertencente ao município de Novo Repartimento - PA.

Fonte: Arquivo pessoal.

6 DISCUSSÃO

A leptospirose bovina já foi constatada no município de Novo Repartimento através de um estudo soroepidemiológico realizado por Chiebão no ano de 2010, o qual detectou 66,9% de bovinos reagentes, não diferindo do resultado obtido no presente trabalho, onde a frequência de reagentes encontrada foi de 65,86%. No trabalho anterior, também foi observado animais reagentes em seis dos setes municípios limítrofes ao Novo Repartimento, variando de 58,3% a 77,3%, sendo *L. interrogans* sorovar Hardjo (Hardjoprajitno) o mais prevalente. Esta retrospectiva sugere que a enfermidade ainda está presente no município em níveis semelhantes, já que as atenções para a sanidade animal na região voltam-se, principalmente, para o controle de doenças de notificação obrigatória como a febre aftosa, brucelose e tuberculose, além de que os animais dos municípios vizinhos podem favorecer a permanência e circulação da bactéria na região.

Na região Amazônica, Negrão et al. (2015) encontraram 39,52% de fêmeas bovinas reagentes para leptospirose em propriedades rurais do município de Soure na Ilha de Marajó - Pará. Outra pesquisa conduzida no município de Uruará, também no Pará, apontou 97% das propriedades de bovinos com pelo menos um animal reagente para leptospirose (HOMEM et al., 2001). Já em Monte Negro - RO foi encontrada uma frequência de 52,8% de bovinos reagentes (AGUIAR et al., 2006).

Em outras regiões do país, a prevalência de animais reagentes para leptospirose foi próxima da encontrada neste trabalho, variando de 49,4% até 76,5% (CASTRO et al., 2008; MIASHIRO, 2013; COELHO et al., 2014; PIMENTA et al., 2014 e ARAÚJO, 2010). Entretanto, Rodrigues et al. (1999) e Martins (2005) registraram frequências menores de animais reagentes em Londrina – PR e Pirassununga – SP, respectivamente.

Pinto et al. (2016) realizaram uma revisão sistemática de estudos que utilizaram o teste de soroaglutinação microscópica (SAM) como diagnóstico da leptospirose bovina em países da América Latina, com destaque para o Brasil, e dentre vários parâmetros adotados, encontraram uma taxa média de animais reagentes de 44,2%.

Os resultados mostraram anticorpos contra quatro das cinco espécies de *Leptospira* que compõem a coleção de antígenos utilizada no presente estudo (Quadro 2): *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai* e *L. kirschneri*,

representadas por seus respectivos sorovares. *L. interrogans* sorovar Hardjo (Hardjoprajitno) foi o mais prevalente com 45,98% das reações, seguido por *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo (Hardjobovis) (43,06%), *L. santarosai* sorovar Guaricura (35,03%), *L. santarosai* sorovar Shermani (29,19%), *L. interrogans* sorovar Hebdomadis (21,16%) e *L. borgpetersenii* sorovar Tarassovi (13,86%).

Favero et al. (2001) encontraram o predomínio de reações para *L. interrogans* sorovar Hardjo (Hardjoprajitno) em bovinos pertencentes a 21 estados brasileiros, incluindo o Pará. Viana et al. (2010) avaliando bovinos em um município do Espírito Santo, constataram que *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo (Hardjobovis) foi o mais frequente. Para a espécie bovina, o sorovar Hardjo, geralmente, é o primeiro com maior número de reações em relação aos demais, este fato, suporta a hipótese de que os bovinos são os hospedeiros naturais deste sorovar (ELLIS, 1994), lembrando que sorologicamente são indistinguíveis, mas geneticamente pertencem a duas espécies distintas (BOLIN, 2003).

L. santarosai sorovar Guaricura foi o terceiro mais frequente, estirpe autóctone que recentemente foi introduzida na coleção de antígenos empregada no diagnóstico sorológico, substituindo-se *L. interrogans* sorovar Wolffi. Quando esta estirpe é utilizada em inquéritos sorológicos, destaca-se como um dos sorovares mais prevalentes, juntamente com o Hardjo, comumente ocupando a posição antes assumida pelo sorovar Wolffi (SARMENTO et al., 2012). O Primeiro relato do isolamento de *L. santarosai* sorovar Guaricura no Brasil foi por Santa Rosa et al. (1980) em bovinos e posteriormente em búfalos por Vasconcellos et al. (2001).

O quarto mais prevalente foi *L. santarosai* sorovar Shermani. Resultado semelhante foi encontrado por Rende; Ávila (2003), onde este sorovar foi o terceiro mais frequente em bovinos de quatro municípios da região nordeste do estado de São Paulo e em um município de Minas Gerais, assim como em pesquisa realizada por Santos (2016), que após o sorogrupo Sejroe, o sorovar Shermani foi o mais prevalente em bovinos no extremo sul do estado da Bahia. Ainda não há relatos do isolamento deste sorovar de bovinos no Brasil.

Resultado interessante foi observado por reações encontradas para *L. interrogans* sorovar Pomona (GR6) estirpe autóctone isolada de suínos abatidos no estado de São Paulo (MIRAGLIA et al., 2008). A inserção desta estirpe na coleção para diagnóstico elevou o número de animais reagentes em comparação com a estirpe padrão de *L. interrogans* sorovar Pomona também utilizada no trabalho.

Não foram detectados animais reagentes para *L. interrogans* sorovar Australis, Bataviae, Pyrogenes, Sentot e *L. noguchii* sorovar Panama. Dados diferentes foram publicados por Langoni et al. (2000), que registraram 27,90% de bovinos reagentes para *L. interrogans* sorovar Pyrogenes e Del Fava et al. (2004), que além de animais reagentes para Pyrogenes, reações foram encontradas para *L. interrogans* sorovar Australis, ambos os trabalhos realizados no estado de São Paulo.

Neste trabalho também foram detectadas muitas amostras de soro sanguíneo que reagiram para mais de um sorovar, principalmente aqueles pertencentes ao mesmo sorogrupo. Quando os animais são vacinados, este fenômeno pode ocorrer, visto que há possibilidade de as vacinas contra leptospirose gerarem reações cruzadas entre os sorovares no teste da SAM (ARDUINO et al., 2009). Apesar de neste estudo não haver registros de vacinação para leptospirose, acredita-se que os animais não foram vacinados, pois o manejo sanitário na região geralmente não inclui vacinação para leptospirose.

A análise pelo sorovar mais provável é outra forma de interpretar os resultados obtidos na sorologia, evitando-se o fenômeno de coaglutinação, considerando o sorovar com maior título, como o infectante. Assim 46,63% dos animais foram reagentes; *L. interrogans* sorovar Hardjo (Hardjoprajitno) e *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo (Hardjobovis) mantiveram-se como os mais prevalentes, sendo os títulos de 400 e 800 mais expressivos para o primeiro sorovar e 200 para o segundo. Em bovinos, o sorovar Hardjo pode gerar níveis baixos de anticorpos, geralmente não ultrapassando títulos de 800, ou até não detectáveis na SAM (KIRKBRIDE, 1990; BOLIN, 2003). Diversas pesquisas também mostram que o sorovar Hardjo se mantém como o mais prevalente em bovinos pela análise do sorovar mais provável (DEL FAVA et al., 2004; FIGUEIREDO et al., 2009; ARAÚJO, 2012; MIASHIRO, 2013).

Leptospira interrogans sorovar canicola foi o quarto sorovar mais prevalente pela análise do sorovar mais provável, com títulos variando de 400 a 1.600. O sorovar canicola é usualmente associado à leptospirose canina (SCANZIANI et al., 1994), tendo o cão como seu hospedeiro natural; entretanto, já foi relatado o isolamento deste sorovar a partir da urina de bovinos no Brasil (ZACARIAS et al. 2008), sugerindo que os cães possam estar participando como fonte de contaminação para os bovinos.

Ainda nesta análise, *L. santarosai* sorovar Guaricura não foi significativo, tendo apenas participação de 1,03%. Prevalência superior foi encontrada por Sarmiento et al. (2012) em Mato Grosso (48,55%), Mato Grosso do Sul (35,40%) e São Paulo (30,51%), estados da região Centro-Oeste e Sudeste do Brasil; contudo, em estados do sul do país como Paraná e Santa Catarina, a prevalência registrada no mesmo trabalho foi baixa. Estas evidências reforçam a oscilação que os sorovares podem apresentar de região para região, influenciados por questões climáticas e ambientais (PLANK; DEAN, 2000; LEVETT, 2001).

Não houve o isolamento de *Leptospira* em nenhuma das 208 amostras de urina submetidas ao cultivo bacteriológico. O isolamento de leptospiros não é fácil, necessita da viabilidade da bactéria nas amostras, o que na maioria das vezes não é possível, interferindo na sensibilidade (GENOVEZ et al., 2001; SCARCELLI et al., 2004), por isso, em muitos casos, o diagnóstico de leptopirose fica restrito a sorologia e detecção molecular. Em animais assintomáticos, a eliminação intermitente da bactéria pela urina e a contaminação dos cultivos também dificultam o isolamento (FAINE et al., 1999).

Langoni et al. (2008) não obtiveram leptospiros isoladas de urina de 140 bovinos em propriedades rurais em Botucatu – SP. Resultado negativo, no isolamento de leptospiros, também foi relatado por Mineiro (2010) em 30 amostras de urina de fêmeas bovinas no Piauí, estes animais apresentavam histórico de problemas reprodutivos e foram reagentes na sorologia para o sorovar Hardjo.

Em pesquisa realizada no Paraná, amostras de urina, rins, fígado e útero de 96 vacas abatidas, foram submetidas ao cultivo bacteriológico, não ocorrendo o isolamento de leptospiros, mesmo que em algumas amostras de urina, a bactéria foi detectada por exame direto sob microscopia de campo escuro (SILVA et al., 2005). Assim como Otaka (2012), que não isolou leptospiros de 139 amostras de urina de bovinos no estado do Rio de Janeiro, sendo que sob microscopia de campo escuro, 24 amostras foram positivas.

Quando o isolamento é positivo, geralmente a prevalência é baixa, envolvendo um grande número de amostras testadas, técnicas laboriosas ou o acompanhamento de animais reagentes na sorologia com ou sem histórico de problemas reprodutivos.

Morais (1994) acompanhou 30 vacas com altos títulos na sorologia para o sorovar Hardjo e presença de distúrbios reprodutivo. Por um determinado período,

realizou 10 coletas de urina deste grupo (300 amostras) e obteve apenas um isolado, tipificado como *L. interrogans* sorovar Hardjo (Hardjoprajitno). Em outro trabalho executado em Pelotas – RS, 250 amostras de rins de bovinos abatidos foram submetidas ao cultivo bacteriológico, resultando em três isolados (1,2%) (SEIXAS NETO, 2012).

Magajevski et al. (2005) isolaram leptospiros do sêmem de cinco touros, através da técnica de inoculação em hamsters e em três amostras de urina pela técnica de diluição seriada, os animais eram provenientes de uma central de inseminação artificial do estado de São Paulo com sorologia positiva.

Durante um ano em coletas de urina de bovinos em um matadouro no Rio de Janeiro, Loureiro et al. (2016) conseguiram cinco isolados de *Leptospira* pertencentes ao sorogrupo Sejroe, as estirpes foram isoladas pela técnica de semeio em meio de EMJH com mistura antibiótica.

A técnica da filtração utilizada no trabalho, comumente não é usada em isolamento de leptospiros para amostras de bovinos, no entanto, exige pouco material e equipamentos, podendo ser uma alternativa em condições adversas, onde não há uma estrutura laboratorial disponível. Alguns trabalhos mostram a eficiência desta técnica no isolamento de leptospiros a partir de amostras de urina (SILVA, et al., 2013; SILVA et al., 2015a; SILVA et al., 2015b); contudo, Escócio et al. (2010) não obtiveram isolamento da bactéria em amostras de urina de ovinos pela técnica referida, ainda que empregaram filtros de maior porosidade (0,45 µm e 0,65 µm).

No ensaio molecular, foi detectado o DNA de *Leptospira* spp. no rim e/ou urina de 35 animais (16,82%), sendo a presença do DNA da bactéria nas amostras de urina (14,90%) maior do que em rins (5,76%). Em uma pesquisa realizada por Mineiro et al. (2011), a PCR detectou o DNA da leptospira em 20 amostras de urina de um total de 40 fêmeas bovinas e em apenas 10 amostras de rim dos mesmos animais.

Genovez et al. (2006) detectaram o DNA da leptospira em sete amostras de urina de 20 fêmeas bovinas com histórico de abortamentos em Nova Odessa – SP. Corrêa et al. (2013) encontraram 8,00% (16/200) de positividade na PCR para *Leptospira* spp. em amostras de rins bovinos abatidos em um matadouro de Ilhéus na Bahia.

Pesquisas em outros países revelam resultados diferentes, como em um estudo realizado no norte do Irã, onde foi encontrada uma frequência de 43,00% de

amostras de urina bovina positivas na PCR para *Leptospira* spp. (SHAFIGHI et al., 2014), e Gamage et al. (2014) que detectaram o DNA da bactéria pela PCR em rins de 20 bovinos, em um total de 164 (12,2%), abatidos em um matadouro da cidade de Colombo no Sri Lanka.

Apesar da PCR ser considerada uma técnica de alta especificidade e sensibilidade, sendo capaz de detectar pequenas quantidades do DNA de microrganismos em diferentes amostras biológicas, alguns fatores são capazes de alterar esta sensibilidade, como substâncias presentes nos materiais clínicos, que podem inibir a reação, gerando resultados falso negativos (LUCCHESI et al., 2004).

No presente trabalho houve a detecção do DNA da bactéria em amostras de rim e/ou urina de algumas fêmeas bovinas não reagentes na SAM. A associação da sorologia com a PCR pode ser muito útil na identificação de animais portadores de leptospiros, que usualmente, eliminam a bactéria na urina por longos períodos, contaminando o ambiente e outros animais do rebanho (LILENBAUM, 1996; LILENBAUM et al., 2009).

A segunda PCR (Sec Y) foi realizada apenas com as amostras positivas na primeira PCR, sem intuito de diagnóstico, mas para que o sequenciamento parcial do gene Sec Y fosse realizado; no entanto, das 43 amostras positivas na primeira PCR, apenas 30 foram positivas para a segunda PCR, essa diferença pode ter ocorrido em virtude da concentração do DNA original extraído, pois mesmo com estas diferenças entre as reações de PCR, não houve falsos positivos, já que todas as amostras foram confirmadas como pertencentes ao gênero *Leptospira* através do sequenciamento parcial do gene Sec Y e/ou *rrs*.

Pelo sequenciamento, as amostras foram identificadas em quatro espécies, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. interrogans* e *L. kirschneri*, formando diferentes clusters com proximidade genética tanto às estirpes autóctones isoladas no Brasil quanto estirpes isoladas em outros países e amostras de referência. Trabalhos revelam resultados satisfatórios na identificação das espécies do gênero *Leptospira* através do sequenciamento parcial do gene Sec Y (VICTORIA et al., 2008; PEREZ; GOARANT, 2010; FERREIRA et al., 2014; HAMOND et al., 2015a; HAMOND et al., 2015b; LOUREIRO et al., 2016; MIOTTO et al., 2016).

A maior prevalência encontrada foi para a espécie *L. borgpetersenii* (56,70%) com a formação de quatro diferentes grupos dentro do mesmo clado. O maior grupo de sequências foi 128 rim, 119 rim, 33 urina, 49 urina, 112 urina, 119

urina, 128 urina, 130 urina, 138 urina, 139 urina, 172 urina e 169 urina, sendo que as amostras 119 e 128 (rim e urina) representam apenas dois animais. As sequências foram idênticas entre elas e com maior proximidade (>99%) a *L. borgpetersenii* (U183 e U291) identificadas a partir de amostras de urina de bovinos abatidos no estado do Rio de Janeiro (HAMOND et al., 2015a), no mesmo trabalho, os autores relataram que estas sequências tiveram similaridade com *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo (Hardjobovis). Segundo Zuerner et al. (1993) a estirpe Hardjobovis pode apresentar uma grande heterogeneidade genética em diferentes regiões geográficas.

A presença efetiva de *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo (Hardjobovis) nos bovinos, foi confirmada pelo grupo de sequências 35 urina e 63 urina, com identidade de 100% para uma amostra (JB 197) de *L. borgpetersenii* sorovar Hardjobovis (BULACH et al., 2006). Apesar do sorovar Hardjo, sorologicamente, ser o mais prevalente em bovinos no Brasil, o isolamento de Hardjobovis ainda é escasso, tendo recentemente o primeiro isolamento desta estirpe da urina de bovinos em Londrina no Paraná (CHIDEROLI et al., 2016). *L. borgpetersenii* parece sofrer uma redução em seu genoma em relação a *L. interrogans*, aspecto que reflete em uma maior sensibilidade as condições ambientais adversas e a sobrevivência fora do hospedeiro (BULACH et al., 2006).

O cluster formado pelas amostras 24 urina e 106 urina apresentaram maior similaridade a um isolado de *L. borgpetersenii* de mamíferos silvestres em Madagáscar (DIETRICH et al., 2014). A sequência 208 urina, teve identidade > 98% com amostras de referências da espécie *L. borgpetersenii* (VICTORIA et al., 2008).

Apenas uma amostra (61 urina) foi identificada como *L. santarosai* com identidade > 98%. Resultados bem diferentes foram relatados por Hamond et al. 2015a e Loureiro et al., 2016, onde a espécie *L. santarosai* é identificada como uma das mais prevalentes em bovinos no Rio de Janeiro. *L. santarosai* está presente em bovinos do município de Novo Repartimento, porém com baixa prevalência, esta circunstância, mais uma vez, reforça que as leptospiros podem ter diferentes ocorrências de uma região para a outra.

L. interrogans foi detectada através do grupo formado pelas amostras 161 rim e 98 urina, e a homologia foi idêntica para uma amostra de referência do sorovar Hardjo (Hardjoprajitno) (VICTORIA et al., 2008). Assim como a estirpe Hardjobovis, Hardjoprajitno também foi identificada no presente trabalho, que ainda associando

aos achados na sorologia, sugerem que ambos os genótipos estão circulando em bovinos na Amazônia.

A espécie *L. kirschneri* foi identificada em 33,30% (10 / 30) das sequências avaliadas. O cluster formado pelas sequências 42 urina, 60 urina, 120 urina e 177 urina foram idênticas a *L. kirschneri* sorovar Galtoni, uma amostra de referência que foi isolada de rins de um bovino na Argentina (TEDESCO et al., 1969; VICTORIA et al., 2008).

O grupo de amostras 157 urina, 188 urina, 140 urina, 105 urina, 67 urina e 30 urina, teve identidade (>95%) mais próxima para amostras de referência *L. kirschneri* sorovar Grippotyphosa e Butembo (VICTORIA et al., 2008), tendo a confirmação conclusiva para a espécie *L. kirschneri*, quando associada ao sequenciamento parcial do gene *rrs*, que revelou uma identidade maior (>98%).

Em alguns países, *L. kirschneri*, já foi isolada de bovinos, como no Zimbabwe (FERESU et al., 1995); Tanzânia (MGODE et al., 2006); México (CARMONA-GASCA et al., 2011) e Sri Lanka (GAMAGE et al., 2014). No Brasil, esta espécie apenas foi detectada na urina de uma vaca em Minas Gerais por meio da técnica de PCR de baixa estrigência (LSSP-PCR) (BOMFIM; KOURY, 2006), mas a possível infecção dos bovinos com *L. kirschneri* ainda é descrita por estudos sorológicos.

Esta prevalência encontrada para *L. kirschneri* nos bovinos de Novo Repartimento pode ter relação com a presença de animais silvestres nas fazendas, implicando em uma possível participação destes animais na leptospirose bovina na região, visto que os animais silvestres, principalmente os pequenos mamíferos, aparentam ser portadores desta espécie de *Leptospira* (FORONDA et al., 2011; HOUEMENOU et al., 2013; MAYER-SCHOLL et al., 2014; OBIEGALA et al., 2016; TADIN et al., 2016).

Nos últimos anos, Novo Repartimento teve uma das maiores áreas desmatadas da Amazônia Legal, isto para o desenvolvimento das principais atividades econômicas do município, como o desdobramento madeireiro e a formação de pastagens para criação de bovinos (MORAIS et al., 2014). Esta situação pode fazer com que os animais silvestres que ali habitavam, busquem alimentos nas fazendas.

No presente trabalho, muitas sequências não foram idênticas a nenhuma das amostras que estão depositadas no Genbank, e mesmo que todas as estirpes

de *Leptospira* de referência não estejam descritas neste banco de dados, implica na possível presença de estirpes locais ainda não caracterizadas.

Outra questão foi a variedade de espécies de *Leptospira* detectadas nos animais de um único município, que apresentou perfil epidemiológico deferente de outras regiões do país, refletindo na dificuldade para o controle da doença, principalmente na administração de uma vacina eficiente que possa contemplar as espécies identificadas.

Apesar do sequenciamento direto de amostras da PCR para identificação das espécies de leptospiros não substituir a cultura bacteriológica (HAMOND et al., 2015a), os dados gerados são valiosos para complementar a epidemiologia da doença em bovinos na Amazônia e suscitar o desenvolvimento de mais pesquisas.

Quanto às análises realizadas nas amostras dos fetos, não foi possível detectar anticorpos anti-*Leptospira* spp. no pool dos líquidos cavitários e nem o DNA da bactéria no pool de órgãos e conteúdo gástrico. Ressalta-se que os fetos processados na pesquisa não foram abortados naturalmente, e sim colhidos aleatoriamente durante o abate das fêmeas que estavam prenhes, ou seja, poderiam nascer normalmente.

Avaliando 213 fetos bovinos não abortados, colhidos em um matadouro no estado de São Paulo, Magajevski et al. (2007) não encontraram animais reagentes na SAM e nem positivos na PCR para *Leptospira* spp., todavia isolaram três amostras de leptospira nos órgãos de alguns destes fetos. Usualmente, os trabalhos de leptospirose em fetos bovinos envolvem animais abortados naturalmente, encaminhados para diagnóstico sorológico, bacteriológico e/ou molecular (KIRKBRIDE; JOHNSON, 1989; GENOVEZ et al., 1993; CORTEZ et al., 2006).

Mesmo todos os fetos sendo negativos nos ensaios laboratoriais, em alguns animais (10/58), com idade fetal entre 5 e 8 meses, foram observadas alterações patológicas macroscópicas nos órgãos sugestivas de leptospirose, como fígado de coloração amarelada e hemorragia, igualmente descrito por Antoniassi et al. (2013) que diagnosticaram leptospirose em três de 490 fetos bovinos abortados, dos quais dois apresentavam icterícia e hemorragia.

7 CONCLUSÕES

A leptospirose bovina está presente no município de Novo Repartimento – Pará, tendo *L. interrogans* sorovar Hardjo (Hardjoprajitno) e *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo (Hardjobovis) os mais prevalentes.

Não houve o isolamento de leptospiros a partir das urinas das fêmeas submetidas ao cultivo bacteriológico, porém, a PCR detectou o DNA da bactéria em amostras de rim e/ou urina de animais reagentes e não reagentes na sorologia, evidenciando a presença de portadores renais.

Quatro espécies de *Leptospira* foram identificadas pelo sequenciamento de DNA direto dos produtos da PCR. *L. borgpetersenii* foi a mais prevalente, seguida por *L. kirschneri*, *L. interrogans* e *L. santarosai*.

Em nenhum dos fetos foram detectados anticorpos anti- *Leptospira* spp. e nem o DNA da bactéria no pool de órgãos e conteúdo gástrico.

REFERÊNCIAS

- ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Leptospirosis. In: Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3. ed. Washington: **Organización Panamericana de la Salud**, vol. 1, p. 175-186, 2003.
- ADLER, B.; MOCTEZUMA, A. P. Leptospira and Leptospirosis. **Vet Microbiol.** 140(3-4):287-96, jan., 2010.
- AGUIAR, D. M.; GENNARI, S. M.; CAVALCANTE, G. T.; LABRUNA, M. B.; VASCONCELLOS, S. A.; RODRIGUES, A. A. R.; MORAES, Z. M.; CAMARGO, L. M. A. Seroprevalence of *Leptospira* spp. in cattle from Monte Negro Municipality, Western Amazon, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, vol.26, nº. 2, p.102-104, apr. /jun., 2006.
- AHMED, A.; ENGELBERTS, M.F.; BOER, K. R.; AHMED, N.; HARTSKEERL, R.A. Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic *Leptospira* species in clinical materials. **PLoS ONE**, vol. 4, nº. 9, p. 8, sep., 2009.
- AHMED, N.; DEVI, S. M.; VALVERDE, M. D. L. Á.; VIJAYACHARI, P.; MACHANG, R. S.; ELLIS, W. A.; HARTSKEERL, R. A. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, vol. 10, p. 10, nov., 2006.
- ALBUQUERQUE, N. F.; MARTINS, G.; MEDEIROS, L.; LILENBAUM, W.; RIBEIRO, V. M. F. The role of capybaras as carriers of leptospires in periurban and rural areas in the western Amazon. **Acta Tropica**, vol. 169, p. 57-61, may., 2017.
- ANTONIASSI, N. A. B.; JUFFO, G. D.; SANTOS, A. S.; PESCADOR, C. A.; CORBELLINI, L. G.; DRIEMEIER, D. Causas de aborto bovino diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da UFRGS de 2003 a 2011. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, vol.33, nº. 2, p.155-160, fev., 2013.
- ARAÚJO, B. M. **Soroepidemiologia da infecção por *Leptospira* spp. Em bovinos, equídeos, caninos e trabalhadores rurais em assentamento no município de Aragominas, Tocantins, Brasil.** 2010. 112p. Tese (Doutorado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.
- ARAÚJO, K. S. M. **Detecção de anticorpos e pesquisa de DNA de *Leptospira* spp. e *Brucella* spp. em bovinos abatidos no estado do Rio Grande do Norte.** 2012. 84p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Semi- Árido, Mossoró, 2012.

ARDUINO, G.G.C.; GIRIO, R.J.S.; MAGAJEVSKI, F.S.; PEREIRA, G.T. Títulos de anticorpos aglutinantes induzidos por vacinas comerciais contra leptospirose bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, nº. 7, p.575-582, jul., 2009.

AZEVEDO, S. S.; ALVES, C. J.; LIMA, F. S.; CLEMENTINO, I. J.; BATISTA, C. S. A. Comparação de duas técnicas para isolamento de *Leptospira* spp. a partir do tecido renal de ovinos. **Ciência Animal**, vol. 13, nº. 1, p. 33-37, mai., 2003.

BAL, A. E.; GRAVEKAMP, C.; HARTSKEERL, R. A.; DE MEZA-BREWSTER, J.; KORVER, H.; TERPSTRA, W. J. Detection of Leptospire in Urine by PCR for Early Diagnosis of Leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 32, nº. 8, p. 1894-1898, aug., 1994.

BALAMURUNGAN, V.; GANGADHAR, N. L.; MOHANDOSS, N.; THIRUMALESH, S. R. A.; DHAR, M.; SHOME, R.; KRISHNAMOORTHU, P.; PRABHUDAS, K.; RAHMAN, H. Characterization of *Leptospira* isolates form animals and humans: phylogenetic analysis identifies the prevalence of intermediate species in India. **Springerplus**, 2: 362, jul., 2013.

BARR, C. B.; ANDERSON, M. L.; BLANCHARD, P. C.; DAFT, B. M.; KINDE, H.; LONRAD, P. A. Bovine fetal encephalitis and myocarditis associated with protozoal infections. **Veterinary Pathology**, vol. 27, p. 354-361, sep., 1990.

BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICARDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; LEVETT, P. N.; GILMAN, R. H.; WILLIG, M. R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet. Infect. Dis.**, 3, 757-71, dec., 2003.

BOLIN, C. A. Diagnosis and control of bovine leptospirosis. In: WESTERN DAIRY MANAGEMENT CONFERENCE, 6, 2003, Reno. Proceedings... Reno, 2003. p. 155-160.

BOMFIM, M. R.; KO, A.; KOURY, M. C. Evaluation of the recombinant LipL 32 in enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine leptospirosis. **Vet. Microbiol.**, 109(1-2), p. 89-94, aug., 2005.

BOMFIM, M. R.; KOURY, M. C. Evaluation of LSSP-PCR for identification of *Leptospira* spp. in urine samples of cattle with clinical suspicion of leptospirosis. **Vet. Microbiol.**, Vol. 118, nº.3-4, p. 278-288, dec., 2006.

BOURHY, P.; COLLET, L.; BRISSE, S.; PICARDEAU, M. *Leptospira mayottensis* sp. nov., a pathogenic species of the genus *Leptospira* isolated from humans. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 64, p. 4061–4067, dec., 2014.

BOURHY, P.; HERRMANN STORCK, C.; THEODOSE, R.; OLIVE, C.; NICOLAS, M.; HOCHEDÉZ, P.; LAMAURY, I.; ZININI, F.; BRÉMONT, S.; LANDIER, A.; CASSADOU, S.; ROSINE, J.; PICARDEAU, M. Serovar diversity of pathogenic *Leptospira* circulating in the French West Indies. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. vol.7, nº. 3, p. 10, mar., 2013.

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

BULACH, D. M.; ZUERNER, R. L.; WILSON, P.; SEEMANNT, T.; MCGRATH, A.; CULLEN, P. A.; DAVIS, J.; JOHNSON, M.; KUCZEK, E.; ALT, D. P.; BURCH, B. P.; COPPEL, R. L.; ROOD, J. L.; DAVIES, J. K.; ADLER, B. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. **PNAS**, vol. 103, nº. 39, p. 14560-14565, sep., 2006.

CAMARGO, C. R. A.; VASCONCELLOS, S. A.; NÜRMBERGER JR., R.; PASSOS, E. C.; MORAIS, Z. M.; VISINTIN, J. A. Investigação sobre a presença de leptospiros nos ovários de hamsters experimentalmente infectados com *Leptospira interrogans* sorotipo pomona. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo -SP, vol. 30, nº. 2, p. 129-135, 1993.

CARMONA-GASCA, C. A.; LARA, L. L.; CASTILLO-SÁNCHEZ, L. O.; RAMÍREZ-ORTEGA, J. M.; KO, A.; PALOMERA, C. L.; PEÑA-MOCTEZUMA, A. Detection of *Leptospira santarosai* and *L. kirschneri* in cattle: new isolates with potential impact in bovine production and public health. **Vet. Méx.**, vol.42, nº 4, p. 277-288, oct./dec., 2011.

CASTRO, V.; AZEVEDO, S. S.; GOTTI, T. B.; BATISTA, C. S. A.; GENTILI, J.; MORAES, Z. M.; SOUZA, G. O.; VASCONCELLOS, S. A.; GENOVEZ, M. E. Soroprevalência da leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no estado de São Paulo Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, vol.75, nº. 1, p.11, jan. /mar., 2008.

CHAKRABORTY, A.; MIYAHARA, S.; VILLANUEVA, S. Y. A. M.; SAITO, M.; GLORIANI, N. G.; YOSHIDA, S. A novel combination of selective agents for isolation of *Leptospira* species. **Microbiol. Immunol.**, vol., 55, p. 494-501, jul., 2011.

CHIARELI, D.; COSATE, M. R. V.; MOREIRA, E. C.; LEITE, R. C.; LOBATO, F. C. F.; SILVAS, J. A.; TEIXEIRA, J. F. B.; MARCELINO, A. Controle da leptospirose em bovinos de leite com vacina autógena em Santo Antônio do Monte, Minas Gerais. **Pesq. Vet. Bras.**, vol. 32, nº. 7, p.633-639, jul., 2012.

CHIDEROLI, R. T.; PEREIRA, U. P.; GONÇALVES, D. D.; NAKAMURA, A. Y.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F.; FREITAS, J. C. Isolation and molecular characterization of *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo strain Hardjobovis in the urine of naturally infected cattle in Brazil. **Genet. Mol. Res.** 15 (7), feb., 2016.

CHIEBÃO, D. P. **Frequência de anticorpos anti- *Neospora caninum*, anti-*Brucella abortus* e anti- *Leptospira* spp. em bovinos do Estado do Pará: estudo de possíveis variáveis para ocorrência de infecção.** 2010. 109p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2010.

CHOMCZYNSKI, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **Biotechniques**, vol.15, nº. 3, p. 532-534, sep., 1993.

COELHO, E. L. M.; CHAVES, N. P.; SÁ, J. C.; MELO, S. A.; SILVA, A. L. A. Prevalência de leptospirose em fêmeas bovinas abatidas em frigoríficos no município de São Luís. **Rev. Bras. Med. Vet.**, vol. 36, nº 2, p.111-115, abr./jun., 2014.

COLE, J. R.; SULZER, C. R.; PULSSELY, A. R. Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination. **Appl. Microbiol.**, vol. 25, nº. 6, p. 976-980, jun., 1973.

CORRÊA, J. M. X.; CARVALHO, F. S.; CARLOS, R. S. A, WENCESLAU, A. A. Investigação molecular de *Leptospira* spp. em rins de bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, vol. 41, nº. 1, p. 6, jan., 2013.

CORTEZ, A.; CASTRO, A. M. G.; HEINEMANN, M. B.; SOARES, R. M.; LEITE, R.C.; SCARCELLI, E.; GENOVEZ, M.E.; ALFIERI, A. A.; RICHTZENHAIN, L.J. Detecção de ácidos nucleicos de *Brucella* spp., *Leptospira* spp., herpesvirus bovino e vírus da diarreia viral bovina, em fetos abortados e em animais mortos no perinatal. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, vol .58, nº. 6, p.1226-1228, dec., 2006.

DAHER, E.F.; ABREU, K.L.S.; SILVA JUNIOR, G.B. Leptospirosis-associated acute kidney injury. **Journal of Brazilian Nefrology**. vol. 4, nº. 43, p. 408-415, ago., 2010.

DEHKORDI, J.; SHAHBAZKIA, H, R.; RONAGH, N. Evaluation of pathogenic serovars of *Leptospira interrogans* in dairy cattle herds of Shahrekord by PCR. **Iran. J. Microbiol.**, vol. 3, nº. 3, p. 135-139, sep., 2011.

DEL FAVA, C.; ARCARO, J. R. P.; POZZI, C.R.; ARCARO JÚNIOR, I.; FAGUNDES, H.; PITUCO, E. M.; DE STEFANO, E.; OKUDA, L. H.; VASCONCELLOS, S. A. Manejo sanitário para o controle de doenças da reprodução em um sistema leiteiro de produção semi-intensivo. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, vol. 70, nº. 1, p.25-33, jan./mar., 2003.

DEL FAVA, C.; VASCONCELLOS, S. A.; D'ANGELINO, J. L.; MORAIS, Z. M.; FIGUEIREDO, L. A.; RAZOOK, A. G.; CYRILLO, J. N. S. G.; OLIVEIRA, J. V.; REICHERT, R. H. Coeficientes reprodutivos e soropositividade para *Leptospira* spp. em um rebanho bovino de corte no Estado de São Paulo, Brasil. **Ars. Veterinaria**, Jaboticabal, SP, Vol. 20, nº. 1, 052-061, 2004.

DIETRICH, M.; WILKINSON, D. A.; SOARIMALALA, V.; GOODMAN, S. M.; DELLAGI, K.; TORTOSA, P. Diversification of an emerging pathogen in a biodiversity hotspot: *Leptospira* In Endemic small mammals of Madagascar. **Mol. Ecol.**, vol. 23, nº. 11, p. 2783-2796, jun., 2014.

ELLIS, W. A. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, vol.10, p.463-478, nov., 1994.

ELLIS, W. A.; THIERMANN, A. B. Isolation of leptospires from the genital tracts of Iowa cows. **Am. J. Vet. Res.**, 47, p. 1694–1696, Aug., 1986.

ESCÓCIO, C.; GENOVEZ, M. E.; CASTRO, V.; PIATTI, R. M.; GABRIEL, F. H. L. CHIEBÃO, D. P.; AZEVEDO, S. S.; VIEIRA, S. R. CHIBA, M. Influência das condições ambientais na transmissão da leptospirose entre criações de ovinos em bovinos da região de Sorocaba, SP. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, vol.77, nº.3, p. 371-379, jul. /set., 2010.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. **Leptospira and leptospirosis**. 2nd. ed. Melbourne: Medi. Sci., 1999. 272p.

FAVERO, M.; PINHEIRO, S. R.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z. M.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S. Leptospirose bovina – variantes sorológicas predominantes em colheitas efetuadas no período de 1984-1997 em rebanhos de 21 estados do Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, vol. 68, nº. 2, p. 29-35, jul. /dez., 2001.

FERESU, S. B.; BOLIN, C. A.; KORVER, H.; KEMP, H. Identification of leptospires of the Pomona and Grippotyphosa serogroups isolated from cattle in Zimbabwe. **Res. Vet. Sci.**, vol. 59, nº.1, p. 92–94, jul., 1995.

FERREIRA, A. S.; COSTA, P.; ROCHA, T.; AMARO, A.; VIEIRA, M. L.; AHMED, A.; THOMPSON, G.; HARTSKEERL, R. A.; INÁCIO, J. Direct Detection and Differentiation of Pathogenic *Leptospira* Species Using a Multi-Gene Targeted Real Time PCR Approach. **PLoS ONE**, vol. 9, nº. 11, p. 11, nov., 2014.

FIGUEIREDO, A. O.; PELLEGRIN, A. O.; GONÇALVES, V. S. P.; FREITAS, E. B.; MONTEIRO, L. A. R. C.; OLIVEIRA, J. M.; OSÓRIO, A. L. A. R. Prevalência e fatores de risco para a leptospirose em bovinos de Mato Grosso do Sul. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, vol. 29, nº 5, p.375-381, may., 2009.

FORONDA, P.; MARTIN-ALONSO, A.; CASTILLO-FIGUERUELO, B.; FELIU, C.; GIL, H.; VALLADARES, B. Pathogenic *Leptospira* spp. in wild rodents, Canary Islands, Spain. **Emerg. Infect. Dis.**, vol. 17, nº. 9, p. 1781–1782, sep., 2011.

FRELLSTEDT, L; SLOVIS, N. M. Acute renal disease from *Leptospira interrogans* in three yearlings from the same farm. **Equine Veterinary Education**. Vol. 21, nº. 9, p. 478– 484, sep., 2009.

FREUDENSTEIN, H.; HEIN, B. Potency of leptospiral vaccines and protection against chronic infection in golden hamsters. *Comparative Immunology. Microbiology and Infectious Diseases*, vol. 14, nº. 3, p. 229-234, 1991.

GALTON, M. M.; SULZER, C. R.; SANTA ROSA, C. A.; FIELDS, M. J. Application of microtechnique to the agglutination test for leptospiral antibodies. **Appl. Microbiol.**, vol. 13, nº. 1, p.81-85, jan., 1965.

GAMAGE, C. D.; KOIZUMI, N.; PERERA, A. K.; MUTO, M.; NWAFOR-OKOLI, C.; RANASINGHE, S.; KULARATNE, S. A.; RAJAPAKSE, R. P.; KANDA, K.; LEE, R. B.; OBAYASHI, Y.; OHNISHI, M.; TAMASHIRO, H. Carrier status of leptospirosis among cattle in Sri Lanka: a zoonotic threat to public health. **Transbound. Emerg. Dis.**, vol. 61, nº.1, p.91-96, feb., 2014.

GAROUISSI, M. T.; ATARIE, S.; VODJGANI, M.; GHARAGOZLOO, F.; VAND E USSEFI, J. The prevalence and control of bovine mastitis in *Leptospira* outbreak. **Comparative Clinical Pathology**, vol. 26, p. 189-192, jan., 2017.

GENOVEZ, M. E.; DEL FAVA, C.; CASTRO, V.; GOTTI, T. B.; DIB, C. C.; POZZI, R. C.; ARCARO, J. R. P.; MIYASHIRO, S.; NASSAR, A. F. C.; CIRILLO, S. L. Leptospirosis outbreak in dairy cattle due to *Leptospira* spp. serovar Canicola: reproductive rates and serological profile after treatment with streptomycin sulfate. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, vol. 73, nº. 4, p. 389-393, out. /dec., 2006.

GENOVEZ, M. E.; OLIVEIRA, J. C. F.; CASTRO, V.; FERRARI, C. I. L.; SCARCELLI, E.; CARDOSO, M. V.; PAULIN, L. M.; LANÇA NETO, P. Serological profile of a nelore herd presenting endemic leptospirosis and submitted to vaccination. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, vol. 71, nº. 4, p.411-416, out./dez., 2004.

GENOVEZ, M. E.; SCARCELLI, E.; PIATTI, R. M.; CASTRO, V.; FERRARI, C. I. L.; GRASSO, L. M. P. S.; CARDOSO, M. V. Polymerase Chain Reaction (PCR) as a fundamental tool in the diagnosis of endemic leptospirosis in a cattle herd. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 11., 2001, Foz do Iguaçu. Anais... São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2001. p.190.

GENOVEZ, M. E.; SCARCELLI, E.; ROJAS, S.; GIORGI, W.; KANETO, C. N. Isolamentos bacterianos de fetos abortados bovinos examinados no Instituto

Biológico de São Paulo, no período de 1985 a 1992. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, vol.30, p.107-112, jul., 1993.

GIRIO, T. M. S.; MAGAJEVSKI, F. S.; GIRIO, R. J. S.; MIASHYRO, S.; RODRIGUES, L. H.; SCARCELLI, E. P.; TOMA, S. B. Uso de estreptomicina na eliminação da leptospiúria em touros (*Bos taurus indicus*) naturalmente infectados pelo sorovar Hardjo. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, vol. 72, nº.2, p.161-170, abr./jun., 2005.

GONÇALVES, A. T.; PAIVA, C.; MELO-MOTA, F.; VIEIRA, M. L.; CARREIRA, T.; NUNES, M. S.; MOTA-VIEIRA, L.; HARSTKEERL, R. A.; HYDE, K.; COLLARES-PEREIRA, M. First isolation of human *Leptospira* strains, Azores, Portugal. **Int. J. Infect. Dis.**, vol. 14, Suppl. 3, p. 148-153, sep., 2010.

HAMOND, C.; PESTANA, C. P.; MEDEIROS, M. A.; LILENBAUM, W. Genotyping of *Leptospira* directly in urine samples of cattle demonstrates a diversity of species and strains in Brazil. **Epidemiol. Infect.**, vol. 144, p. 72 –75, jan., 2015a.

HAMOND, C.; MARTINS, G.; LOUREIRO, A. P.; BREMONT, S.; MEDEIROS, M. A.; BOURHY, P.; LILENBAUM, W. First isolation and characterization of *Leptospira interrogans* serogroup Australis from swine in Brazil. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, vol. 35, nº. 1, p.6-8, jan., 2015b.

HAIRGROVE, T. (2004). Leptospirosis in cattle. **AABP Proceedings**. Vol. 37. 2004.

HARTSKEERL, R. A.; COLLARES-PEREIRA; ELLIS, B. A. Emergence, control and re-emerging leptospirosis – dynamics of infection in the changing world. **Clin. Microbiol. Infect.**, 17: 494-501, 2011.

HASHIMOTO, V. Y.; GARCIA, J. L.; SPOHR, K. A. H.; DA SILVA, F. G.; ALVES, L. A.; FREITAS, J. C. Prevalência de anticorpos contra *Leptospira* spp. em bovinos, caninos, equinos, ovinos e suínos do município de Jaguapitã, estado do Paraná, Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, vol. 77, nº. 3, p.521-524, jul./set., 2010.

HEINEMANN, M.B.; GARCIA, J.F.; NUNES, C.M.; MORIA, Z.M.; GREGORI, F.; CORTEZ, A.; VASCONCELLOS, S.A.; VISINTIN, J.A.; RICHTZENHAIN, L.J. Detection of leptospires in bovine semen by polymerase chain reaction. **Aust. Vet. J.**, 77(1), p. 32-34, jan., 1999.

HEINEMANN, M. B.; GARCIA, J. F.; NUNES, C. M.; GREGORI, F.; HIGA, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; RICHTZENHAIN, L. J. Detection and differentiation of *Leptospira* spp. serovars in bovine semen by Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism. **Vet. Microbiol.**, 73(4), p. 261-267, may., 2000.

HERRMANN, G. P.; LAGE, A. P.; MOREIRA, E. C.; HADDAD, J. P. A.; RESENDE, J. R.; RODRIGUES, R. O.; LEITE, R. C. Soroprevalência de aglutininas anti-*Leptospira* spp. em ovinos nas Mesorregiões Sudeste e Sudoeste do Estado Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, vol. 34, nº. 2, p. 443-448, mar./abr., 2004.

HIGGINS, R. J.; HARBOURNE, J. F.; STEVENS, A. E. Mastitis and abortion in dairy cattle associated with *Leptospira* of serotype Hardjo. **Vet. Rec.**, 107(13), p.307-310, sep., 1980.

HOMEM, V. S. F.; HEINEMANN, M. B.; MORAIS, Z. M; VASCONCELLOS, S. A.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S. Estudo epidemiológico da leptospirose bovina e humana na Amazônia oriental brasileira. **Rev. Soc. Brasileira Med. Tropical**, Uberaba, vol. 34, nº. 2, p. 173-180, mar./ apr., 2001.

HOOKEY, J. V.; BRYDEN, J.; GATEHOUSE, L. The use of 16s rDNA sequence analysis to investigate the phylogeny of *Leptospiraceae* and related spirochaetes. **J. Gen. Microbiol.**, 139(11), p. 2585-2590, nov., 1993.

HOUEMENOU, G.; AHMED, A.; LIBOIS, R.; HARTSKEERL. *Leptospira* spp. Prevalence in Small Mammal Populations in Cotonou, Benin. **ISRN Epidemiology**, vol. 2013, p. 8, feb., 2013.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Cidades**. 2016. Disponível em: <http://cidades.ibge.gov.br/v3/cidades/municipio/1505064>. Acesso em 20 abr. 2017.

JUNQUEIRA, J. R. C.; ALFIERI, A. A. Falhas da reprodução na pecuária bovina de corte com ênfase para causas infecciosas. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, vol. 27, nº. 2, p. 289-298, abr./Jun., 2006.

JUNQUEIRA, J. R. C.; FREITAS, J. C.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Avaliação do desempenho reprodutivo de um rebanho bovino de corte naturalmente infectado com o BoHV-1, BVDV e *Leptospira* hardjo. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, vol. 27, nº. 3, p. 471-480, jul./set., 2006.

KHAMESIPOUR, F.; DEHKORDI, S. N.; HAFSHEJANI, T. T.; TAJBAKHSH, E.; AZIZI, S. Determine the prevalence of *Brucella* spp. and *Leptospira* spp. in blood samples by multiplex polymerase chain. **Veterinary Science Development**, vol. 4:5351, p. 18-22, mar., 2014.

KIRKBRIDE, C. A.; JOHNSON, M. W. Serologic examination of aborted ovine and bovine fetal fluids for the diagnosis of border disease, bluetongue, bovine viral diarrhea, and leptospiral infections. **Journal of Veterinary Diagnostically Investigation**. vol.1, nº.2, p.132- 138, apr., 1989.

KIRKBRIDE, C. A. **Laboratory Diagnosis of Livestock abortion**. 3. ed. Ames: State University Press, 1990. p. 59-65.

LANGONI, L. Leptospirose: aspectos de saúde animal e de saúde pública. **Revista de Educação Continuada do CRMV – SP**, vol. 2, n. 1, p.52-58, 1999.

LANGONI, H., SOUZA, L.C., SILVA, A.V., LUVIZOTTO, M.C.R., PAES, A.C., LUCHESI, S.B. Incidence of leptospiral abortion in Brazilian dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, vol. 40, nº. 3-4, p. 271-275, jun., 1999.

LANGONI, H.; MEIRELES, L. R.; GOTTSCHALK, S.; CABRAL, K. G.; DILVA, A. V. Perfil sorológico da leptospirose bovina em regiões do Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo. vol. 67, nº. 1, 2000.

LANGONI, H.; SOUZA, L. C.; DA SILVA, A. V.; CUNHA, E. L. P.; SILVA, R. C. Epidemiological aspects in leptospirosis. Research of anti-*Leptospira* spp antibodies, isolation and biomolecular research in bovines, rodents and workers in rural properties from Botucatu, SP, Brazil. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, São Paulo, vol. 45, nº. 3, p. 190-199, 2008.

LEMOES, J. P.; MELO, C. B; VIEGAS, S. A. R. A. Análise sorológica de *Leptospira* spp. em cães errantes no município de Aracajú. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Ano VIII, número 14, jan., 2010.

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

LEVETT, P. N.; MOREY, R. E.; GALLOWAY, R. L.; STEIGERWALT, A. G. *Leptospira broomii* sp. nov., isolated from humans with leptospirosis. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, vol. 56, nº. 3, p. 671-673, 2006.

LOUREIRO, A. P.; HAMOND, C.; PINTO, P.; BREMONT, S.; BOURHY, P.; LILENBAUM, W. 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**, vol. 105, p.249-253, apr., 2016.

LOUREIRO, A. P.; PESTANA, C.; MEDEIROS, M. A.; LILENBAUM, W. High frequency of leptospiral vaginal carriers among slaughtered cows. **Anim Reprod Sci.**, 178, p. 50-54, mar., 2017.

LILENBAUM, W. Atualização em leptospiroses bovinas. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, vol. 18, nº. 1, p. 9-13, 1996.

LILENBAUM, W.; VARGES, R.; RISTOW, P.; CORTEZ, A.; SOUZA, S. O.; RICHTZENHAIN, L. J.; VASCONCELLOS, S. A. Identification of *Leptospira* spp. carriers among seroreactive goats and sheep by polymerase chain reaction. **Res Vet Sci.**, vol. 87, nº. 1, p. 16-19, aug., 2009.

LUCCHESI, P. M. A.; ARROYO; GUILLERMO, H.; ETCHEVERRÍA; ANALÍA; PARMA, A. E.; EIJO, A. C. Recomendações para detecção de *Leptospira* em urina pela PCR. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, vol. 37, nº. 2, p.131-134, mar., 2004.

MAGAJEVSKI, F. S.; GIRIO, R. J. S.; MATHIAS, L. A.; MYASHIRO, S.; GENOVEZ, M.E.; SCARCELLI, E.P. Detection of *Leptospira* spp. in the semen and urine of bulls serologically reactive to *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, vol.36, nº.1, p.43-47, jan. /mar., 2005.

MAGAJEVISK, F.S.; GIRIO, R.J.S.; MEIRELLES, R.B. Pesquisa de *Leptospira* em fetos de vacas abatidas no estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, vol. 74, nº. 2 p. 67-72, abr./jun., 2007.

MARTINS, G.; LOUREIRO, A. P.; HAMOND, C.; PINNA, M. H.; BREMONT, S.; BOURHY, P.; LILENBAUM, W. First isolation of *Leptospira noguchii* serogroups Panama and Autumnalis from cattle. **Epidemiol. Infect.**, 143(7), p. 1538-1541, may., 2015.

MARTINS, L.S. **Situação epidemiológica da leptospirose bovina, canina e humana na área rural do município de Pirassununga, SP.** 2005. 79p.Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

MATTHIAS, M. A.; RICALDI, J. N.; CESPEDES, M.; DIAZ, M. M.; GALLOWAY, R. L.; SAITO, M.; STEIGERWALT, A. G.; PATRA, K. P.; ORE, C. V.; GOTUZZO, E.; GILMAN, R. H.; LLEVETT, P. N.; VINETZ, J. M. *Leptospira licerasiae* sp. nov. In List of New Names and New Combinations Previously Effectively, but not Validly, Published, Validation List nº. 125. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 59, 1–2, 2009.

MAYER-SCHOLL, A.; HAMMERL, J. A.; SCHMIDT, S.; ULRICH, F. G.; PFEFFER, M.; WOLL, D.; SCHOLZ, H. C.; THOMAS, A.; NÖCKLER, K. *Leptospira* spp. in Rodents and Shrews in Germany. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, vol. 11, nº. 8, p. 7562-7574, jul., 2014.

MÉRIEN, F.; AMOURIAUX, P.; PEROLAT, P.; BARANTON, G.; SANINT-GIRONS, T. Polymerase chain reaction goes detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. **J. Clin. Microbiol.**, vol. 30, nº. 9, p. 2219-2224, sep., 1992.

MGOODE, G. F.; MACHANG'U, R. S.; GORIS, M. G.; ENGELBERT, M.; SONDIJ, S.; HARTSKEERL, R. A. New *Leptospira* serovar Sokoine of serogroup

Icterohaemorrhagiae from cattle in Tanzania. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, vol.56, nº. 3, p. 593-597, mar., 2006.

MIASHIRO, A. F. **Prevalência de leptospirose em rebanhos bovinos no Pantanal de Mato Grosso do Sul, Brasil**. 2013. 52p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2013.

MINEIRO, A. L. B. B.; BEZERRA, E. E. A.; VASCONCELLOS, S. A.; COSTA, F. A. L.; MACEDO, N.A. Infecção por leptospira em bovinos e sua associação com transtornos reprodutivos e condições climáticas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, vol.59, nº.5, p.1103-1109, jul., 2007.

MINEIRO, A. L. B. B. **Leptospirose bovina na bacia leiteira de Parnaíba – PI, Brasil**. 2010. 55p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2010.

MINEIRO, A. L. B. B.; VIEIRA, R. J.; COSTA, E. A.; SANTOS, R. L.; GONÇALVES, L. M. F.; CARVALHO, S. M.; BOMFIM, M. R. Q.; COSTA, F. A. L. Serology, polymerase chain reaction and histopathology for leptospirosis in samples collected at slaughter from dairy cows of Parnaíba region, state of Piauí, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, vol. 31, nº. 10, p. 859-866, oct., 2011.

MIOTTO, B. A.; MORENO, L. Z.; GUILLOUX, A. G.; SOUSA, G. O.; LOUREIRO, A. P.; MORENO, A. M.; LILENBAUM, W.; VASCONCELLOS, S. A.; HEINEMANN, M. B.; HAGIWARA, M.K. Molecular and Serological characterization of the first *Leptospira santarosai* strain isolated from a dog. **Acta Trop.**, 162, p.1-4, oct., 2016.

MIRAGLIA, F.; MORAES, Z. M.; MELVILLE, P. A.; DIAS, R. A.; VASCONCELLOS, S. A. EMJH médium with 5-Fluorouacil and Nalidixic Acid associated with serial dilution technique used to recover *Leptospira* spp. from experimentally contaminated bovine sêmen. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, vol.40, nº.1, jan./mar., 2009.

MIRAGLIA, F.; MORENO, A. M.; GOMES, C. R.; PAIXÃO, R.; LIUSON, E.; MORAIS, Z. M.; MAIORKA, P. C.; SEIXAS, F. K.; DELLAGOSTIN, O. A.; VASCONCELLOS, S. A. Isolation and characterization of *Lepospira interrogans* form pigs slaughtered in São Paulo State, Brazil. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, vol. 39, nº. 3, p. 501-507, jul. / sep., 2008.

MOMTAZ, H.; MOSHKELANI, S. Detection and characterization of *Leptospira* spp. isolated from aborted bovine clinical samples. **Acta Vet. Brno**, 81, p. 021–025, feb., 2012.

MOORE, D.P.; CAMPERO, C.M.; ODEON, A.C.; BARDON, J.C.; SILVA-PAULO, P.; PAOLICCHI, F.A.; CIPOLLA, A.L. Humoral immune response to infections agentes in

aborted bovine fetuses in Argentina. **Revista Argentina de Microbiologia**, vol.35, nº.3, p.143-148, jul./sep., 2003.

MORAIS, B. A.; ARAÚJO, J. O.; PENA, H. A. Analisando a estrutura produtiva do município de Novo Repartimento, Pará, Brasil com ênfase no desdobramento de madeira e criação de bovinos. **Revista acadêmica de economia**, Número 194, p.15, 2014.

MORAIS, M. H. F. **Isolamento de *Leptospira hardjo* em rebanho bovino com problemas de reprodução**. 1994. 56p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1994.

MOREIRA, E. C. **Avaliação de métodos para erradicação de leptospiroses em bovinos leiteiros**. 1994. 110p. Tese (Doutorado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1994.

MOREY, R. E.; GALLOWAY, R. L.; BRAGG, S. L.; STEIGERWALT, A. G.; MAYER, L. W.; LEVETT, P. N. Species-Specific Identification of Leptospiraceae by 16S rRNA Gene Sequencing. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 44, nº. 10, p. 3510-3516, oct., 2006.

NEGRÃO, A. M. G.; BRITO, T. C.; RODRIGUES, E. D. L.; MOURA, T. P. C.; BARRA, E. C. M.; CASSEB, A. R. Análise sorológica da leptospirose em bovinos de propriedades rurais do Marajó- Região Amazônica. In: 42º CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA E 1º CONGRESSO SUL-BRASILEIRO DA ANCLIVEPA, 2015, Curitiba – PR. Anais...Curitiba, 2015, p. 2163-2167.

NGBEDE, E. O.; RAJI, M. A.; KWANASHIE, C. N.; OKOLOCHA, E. C. Serosurvey of *Leptospira* spp. serovar Hardjo in cattle from Zaria, Nigeria. **Revue Méd. Vét.**, 164 (2), p. 85-89, feb., 2013.

NOGUCHI, H. Morphological characteristics and nomenclature of *Leptospira* (Spirochaeta) *icterohaemorrhagiae* (Inada and Ido). **J. Exp. Med.** p. 27575-592, 1918.

OBIEGALA, A.; WOLL, D.; KARNATH, C.; SILAGHI, C.; SCHEX, S.; EBBAUER, S.; PFEFFER, M. Prevalence and Genotype Allocation of Pathogenic *Leptospira* Species in Small Mammals from Various Habitat Types in Germany. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, vol. 10, nº. 3, p. 12, mar., 2016.

OSAVA, C. F.; SALABERRY, S. R. S.; NASCIMENTO, C. C. N.; LIMA-RIBEIRO, A. M. C. MOREIRA, R. Q.; CASTRO, J. R.; RIGO, V. H. B. Ocorrência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em diferentes sistemas de criação de suínos. **Biosci. J.**, Uberlândia, vol. 26, nº. 2, p. 202-207, mar./apr., 2010.

OTAKA, D. Y. **Detecção molecular de bovinos portadores de leptospiras no Rio de Janeiro**. 2012. 52p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2012.

PEREZ, J.; GOARANT, C. Rapid *Leptospira* identification by direct sequencing of the diagnostic PCR products in New Caledonia. **BMC Microbiology**, vol.10, p.11, dec., 2010.

PEROLAT, P.; CHAPPEL, R. J.; ADLER, B.; BARANTON, G.; BULACH, D. M.; BILLINGHURST, M. L.; LETOCART, M.; MERIEN, F.; SERRANO, M. S. *Leptospira fainei* sp. nov., isolated from pigs in Australia. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, vol. 48, nº. 3, p. 851-858, 1998.

PINTO, P. S.; LIBONATI, H.; PENNA, B.; LILENBAUM, W. A systematic review on the microscopic agglutination test seroepidemiology of bovine leptospirosis in Latin America. **Trop. Anim. Health. Prod.**, vol. 48, nº 2, p.239–248, feb., 2016.

PINTO, P. S.; PESTANA, C.; MEDEIROS, M. A.; LILENBAUM, W. Plurality of *Leptospira* strains on slaughtered animals suggest a broader concept of adaptability of leptospires to cattle. **Acta Trop.**, 1;172, p. 156-159, may., 2017.

PIMENTA, C. L. R. M.; CASTRO, V.; CLEMENTINO, I. J.; ALVES, C. J.; FERNANDES, L. G.; BRASIL, A. W. L.; SANTOS, C. S. A. B.; AZEVEDO, S. S. Leptospirose bovina no Estado da Paraíba: prevalência e fatores de risco associados à ocorrência de propriedades positivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, vol. 34, nº. 4, p. 332-336, apr., 2014.

PLANK, R.; DEAN, D. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. **Microbes Infect**, 2: 1265-1276, 2000.

POSTIC, D.; RIQUELME-SERTOUR, N.; MERIEN, F.; PEROLAT, P.; BARANTON, G. Interst of partial 16S rDNA gene sequences to resolve heterogeneities between *Leptospira* collections: application to *L. meyeri*. **Res. Microbiol.**, vol. 151, nº. 5, p. 333-341, jun., 2000.

PRAMEELA, D. R.; SREENIVASULU, D.; VIJAYACHARI, P; SRILATHA, C.; VIJAYA LAKSHMI, S. Isolation Studies of *Leptospira* in Andhra Pradesh. **International Journal of Science and Research**, vol. 4, Issue. 11, p. 1620-1625, nov., 2015.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1737 p.

RAJAN, B.; KUMAR, S.; PILLAI, R. M.; ANTONY, P. X.; MUKHOPADHYAY, H. K.; BALAKRISHNAN, S.; RAJKUMAR, N.; SRINIVAS, M. V. Comparative Study on Serodiagnosis of Bovine Leptospirosis by Microagglutination Test (MAT) and Indirect ELISA. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.**, vol. 6, nº. 2, p. 1551-1558, feb., 2017.

RAMADASS, P.; JARVIS, B. D. W.; CORNER, R. J.; PENNY, D.; MARSHALL, R. B. Genetic characterization of pathogenic *Leptospira* species by DNA hybridization. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, vol. 42, nº. 2, p. 215-219, 1992.

RENDE, J. C.; ÁVILA, F.A. Leptospirose bovina: perfil epidemiológico e dinâmica da infecção como zoonose. **ARS Veterinária**, Jaboticabal, vol. 19, nº. 1, p. 71-79, 2003.

REN, S. X.; FU, G.; JIANG, X. G.; ZENG, R.; MIAO, Y. G.; XU, H.; ZHANG, Y. X.; XIONG, H.; LU, G.; JIANG, H. Q.; JIA, J.; TU, Y. F.; JIANG, J. X.; GU, W. Y.; ZHANG, Y. Q.; CAI, Z.; SHENG, H. H.; YIN, H. F.; ZHANG, Y.; ZHU, G. F.; WAN, M.; HUANG, H. L.; QIAN, Z.; WANG, S. Y.; MA, W.; YAO, Z. L.; SHEN, Y.; QIANG, B. Q.; XIA, Q. C.; GUO, X. K.; DANCHIN, A.; SAINT GIRONS, I.; SOMERVILLE, R. L.; WEN, Y.M.; SHI, M. H.; CHEN, Z.; XU, J. G.; ZHAO, G. P. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. **Nature**, 422(6934), p. 888-893, apr., 2003.

RICHTZENHAIN, L. J.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M. B.; SOARES, R. M.; SAKAMOTO, S. M.; VASCONCELLOS, S. A.; HIGA, Z. M. M.; SCARCELLI, E.; GENOVEZ, M. E. A multiplex PCR for detection of *Brucella* spp and *Leptospira* spp. DNA from aborted bovine fetuses. **Veterinary of Microbiology**, vol. 87, p. 139-147, jun., 2002.

RODRIGUES, C.G.; MUELLER, E.E.; FREITAS, J.C. Leptospirose bovina: sorologia na bacia leiteira da região de Londrina, Paraná, Brasil. **Rev. Ciênc. Rural**, Santa Maria, vol.29, nº. 2, p. 309-314, may./ jun., 1999.

ROMERO, E. C.; YASUDA, P. H. Molecular characterization of *Leptospira* sp. strains isolated from human subjects in São Paulo, Brazil using a polymerase chain reaction-based assay: a public health tool. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 101(4), p. 373-378, jun., 2006.

RYAN, E. G.; LEONARD, N.; O'GRADY, L.; MORE, S. J.; DOHERTY, M. L. Seroprevalence of *Leptospira* Hardjo in the Irish suckler cattle population. **Irish Veterinary Journal**, 65:8, p.11, apr., 2012.

SAITO, M.; VILLANUEVA, S. Y.; KAWAMURA, Y.; IIDA, K.; TOMIDA, J.; KANEMARU, T.; KOHNO, E.; MIYAHARA, S.; UMEDA, A.; AMAKO, K.; GLORIANI, N. G.; YOSHIDA, S. *Leptospira idonii* sp. nov., isolated from environmental water. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 63, p. 2457-2462, jul., 2013.

SALDANHA, G. B.; CAVAZINI, N. C.; SILVA, A. S.; FERNANDES, M. B.; BADKE, M. R. T.; PIVETTA, C. G. Sorologia positiva para *Leptospira butembo* em bovinos apresentando problemas reprodutivos. **Cienc. Rural**, Santa Maria, vol. 37, nº. 4, p. 1182-1184, jul./ago. 2007.

SANTA ROSA, C. A.; SULZER, C. R.; CASTRO, A. F. P.; YANAGUITA, R. M.; GIORGI, W. Two new leptospiral serovars in the Hebdomadis group isolated from cattle in Brazil. **International Journal of Zoonoses**, vol. 7, nº. 2, p. 158- 163, dec., 1980.

SANTOS, G. R. **Presença de aglutininas anti-*Leptospira* spp. em bovinos abatidos em frigorífico no extremo sul do estado da Bahia e fatores de risco associados**. 2016. 65p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2016.

SARMENTO, A. M. C.; AZEVEDO, S. S.; MORAIS, Z. M.; SOUZA, G. O.; OLIVEIRA, F. C. S.; GONÇALVES, A. P.; MIRAGLIA, F.; VASCONCELLOS, S.A. 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. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, vol. 32, nº. 7, p. 601–606, jul., 2012.

SCANZIANI, E.; CALCATERRA, S.; TAGLIABUE, S. Serologic findings in cases of acute leptospirosis in the dog. **Journal of Small Animals Practice**. nº. 35, p. 257-260, may., 1994.

SCARCELLI, E.; PIATTI, R.M.; CARDOSO, M.V. Detecção de agentes bacterianos pelas técnicas de isolamento e identificação e PCR - Multiplex em fetos bovinos abortados. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, vol.28, nº. 1, p.23-27, 2004.

SCHULLER, S. FRANCEY, T.; HARTMANN, K.; HUGONNARD, M.; KOHN, B.; NALLY, J. E.; SYKES, J. E. European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats. **Journal of Small Animal Practice**, vol. 56, n. 3, p.159-179, 2015.

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

SHAFIGHI, T.; ZAHRAEL SALEHI, T.; ABDOLLAHPOUR, G.; ASADPOUR, L.; AKBAREIN, H.; SALEHZADEH, A. Molecular detection of *Leptospira* spp. in the urine of cattle in northern Iran. **Iran j. vet Res.**, vol. 15, nº. 4, p. 402–405, may., 2014.

SHIMABUKURO, F. H.; DOMINGUES, P. F.; LANGONI, H.; SILVA, A. V.; PINHEIRO, J. P.; PADOVANI, C. R. Searching of swine leptospiral carrier by microbial isolation and polymerase chain reaction in kidney samples from

serologically positive and negative animals. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, vol.40, nº.4, p.243-253, may., 2003.

SHUKLA, J.; TUTEJA, U.; BATRA, H. V. 16S rRNA PCR for differentiation of pathogenic and nonpathogenic *Leptospira* isolates. **Indian Journal of Medical Microbiology**, vol.21, nº.1, p. 25-30, jun., 2003.

SILVA, F. G.; FREITAS, J. C.; ANZAI, E. K.; HASHIMOTO, V. Y.; GIRALDI, N.; DELBEM, A. C. B.; BRACARENSE, A. P. F. R. L.; REIS, A. C. F.; VASCONCELLOS, S. A. Leptospirae detection in Kidney, liver, and uterus of cows slaughtered in Paraná State, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, vol. 36, nº. 1, p.38-42, jan. /mar., 2005.

SILVA, F. J.; SILVA, T. R.; SILVA, G. C. P.; SANTOS, C. E. P.; ALVES JÚNIOR, J. R. F.; MATHIAS, L. A. Isolation of *Leptospira borgpetersenii* in synanthropic *Didelphis albiventris* in Jaboticabal, São Paulo, Brazil, São Paulo, Brasil. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, vol. 50, nº. 6, p. 457-461, dec., 2013.

SILVA, F. J.; SANTOS, C. E. P.; SILVA, T. R.; SILVA, G. C. P.; LOFFLER, S. G.; BRIHUEGA, B.; ALARCON, F. F.; CURCI, V. C. M.; MATHIAS, L. A. Pesquisa de leptospiros e de anticorpos contra leptospiros em animais e humanos de propriedades rurais nos biomas brasileiros Pantanal e Caatinga. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, vol. 52, nº. 3, p. 234-248, 2015a.

SILVA, F. J.; SILVA, G. C. P.; LOFFLER, S. G.; BRIHUEGA, B.; SAMARTINO, L. E.; ALARCON, M. F. F.; SANTOS, C. E. P.; MATHIAS, L. A. Isolation of *Leptospira* spp. from a man living in a rural area of the Municipality of Cruz Alta, RS, Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, vol.45, nº.1, p. 47-51, jan., 2015b.

SLACK, A. T.; KALAMBAHETI, T.; SYMONDS, M. L.; DOHNT, M. F.; GALLOWAY, R. L.; STEIGERWALT, A. G.; CHAICUMPA, W.; BUNYARAKSYOTIN, G.; CRAIG, S.; HARROWER, B. J.; SMYTHE, L. D. *Leptospira wolffii* sp. nov., isolated from a human with suspected leptospirosis in Thailand. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, vol. 58, p. 2305-2308, oct., 2008.

SLACK, A. T.; KHAJRANI-BELO, B.; SYMONDS, M. L.; DOHNT, M. F.; GALLOWAY, R. L.; STEIGERWALT, A. G.; BAHAMAN, A. R.; CRAIG, S.; HARROWER, B. J.; SMYTHE, L. D. *Leptospira kmetyi* sp. nov., isolated from an environmental source in Malaysia. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 59, p. 705-8, apr., 2009.

SMYTHE, L.; ADLER, B.; HARTSKEERL, R. A.; GALLOWAY, R. L.; TURENNE, C. Y.; LEVETT, P. N. Classification of *Leptospira* genomospecies 1, 3, 4 and 5 as *Leptospira alstonii* sp. nov., *Leptospira vanthielii* sp. nov., *Leptospira terpstrae* sp. nov. and *Leptospira yanagawae* sp. nov., respectively. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 63, p. 1859–1862, sep., 2013.

SMYTHE, L. D.; SYMONDS, M. L.; DOHNT, M.F.; SLACK, A. T.; CORNEY, B. G. Epidemiology of *Leptospira weilii* serovar Topaz infections in Australia. **Communicable Diseases Intelligence Quarterly Report.**, vol. 31, nº. 2, p. 216-222, jun., 2007.

STIMSON, A. M. Note on an organism found in yellow-fever tissue. **Public Health Rep.** 22541. 1907.

SURUJBALLI, O.; MALLORY, M. An indirect enzyme linked immunosorbent assay for the detection of bovine antibodies to multiple *Leptospira* serovars. **Can. J. Vet. Res.**, vol. 68, nº. 1, p. 1–6, jan., 2004.

SZEREDI, L.; HAAKE, D.A. Immunohistochemical identification and pathologic findingd in natural cases of equine abortion caused by leptospiral infection. **Veterinary Pathology**, vol. 43, nº. 5, p. 755-761, sep., 2006.

TADIN, A.; TOKARZ, R.; MARKOTIC, A.; MARGALETIC, J.; TURK, N.; HABUS, J.; SVOBODA, P.; VUCELJA, M.; DESAI, A.; JAIN, K.; LIPKIN, W. I. Molecular Survey of Zoonotic Agents in Rodents and Other Small Mammals in Croatia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, vol. 94, nº. 2, p. 466–473, feb., 2016.

TEDESCO, L. F.; MANRIQUE, G. L.; SULZER, C. R. A new leptospiral serotype in the Canicola serogroup from Argentina. **Trop. Geogr. Med.**, vol. 21, nº. 2, p. 203-206, jun., 1969.

THIERMANN, A. B. Experimental leptospiral infections in pregnant cattle with organisms of the Hebdomadis serogroup. **Am. J. Vet. Res.**, 43, p. 780-4, may., 1982.

THIERMANN, A. B. Isolation of leptospire in diagnosis of leptospirosis. **Modern Veterinary Praticce**, vol. 5, nº. 10, p. 758- 759, oct., 1984.

TOMICH, R. G. P.; BOMFIM, M. R. Q.; KOURY, M. C.; PELLEGRIN, A. O.; PELLEGRIN, L. A.; KO, A. I.; BARBOSA-STANCIOLI, E. F. Leptospirosis serosurvey in bovines from brazilian pantanal using IgG ELISA with recombinant protein LipL 32 and microscopic agglutination test. **Brazilian Journal of Microbiology**, 38, p. 674-680, nov., 2007.

TONIN, A. A.; AZEVEDO, M. I.; ESCOBAR, T. P.; CASASSOLA, I.; SANTOS, L.G.; DA SILVA, A. S.; MARTINS, L. R.; SCHAEFER, P. C.; BADKE, M. R. T. Leptospirose bovina: aumento na incidência da *Leptospira interrogans* sorovar Butembo no rebanho do estado de Santa Catarina, Brasil. **Acta Veterinaria Brasilica**, vol. 4, nº.4, p. 294-297, 2010.

VASCONCELLOS, S. A.; BARBARINI JUNIOR, O.; UMEHARA, O.; MORAIS, Z.M.; CORTEZ, A.; PINHEIRO, S. R.; FERREIRA, F.; FÁVERO, A. C. M.; FERREIRA NETO, J. S. Leptospirose bovina. Níveis de ocorrência e sorotipos predominantes em rebanhos dos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul, no período de janeiro a abril de 1996. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, vol. 64, nº. 2, p.7-15, 1997.

VASCONCELLOS, S. A.; OLIVEIRA, J. C. F.; MORAIS, Z. M.; BARUSELLI, P. S.; AMARAL, R.; PINHEIRO, S. R.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S.; SCHOUBERG, A.; HARTSKEERL, R. A. Isolation of *Leptospira santarosai*, serovar Guaricura from buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Vale do Ribeira, São Paulo, Brazil. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, vol. 32, nº. 4, p.298-300, oct. /dec., 2001.

VASCONCELLOS S. A. Laboratory diagnosis of leptospirosis in animals. In: SIMPOSIO INTERNACIONAL SOBRE LEPTOSPIRA Y LEPTOSPIROSIS EN LAS AMERICAS. 2004, México. Anales... México, DC: División de Educación Continua, Universidad Nacional Autónoma de México, 2004, vol.1, 70-76.

VAN EYS, G. J. J. M.; GRAVEKAMP, C.; GERRITSEN, M. J.; QUINT, W.; CORNELISSEN, M. T. E.; TER SCHEGGET, J.; TERPSTRA, W. J. Detection of Leptospire in Urine by Polymerase Chain Reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 27, nº. 10, p. 2258-2262, oct., 1989.

VIANA, K. F.; ZANINI, M. S.; MOREIRA, E. C. Frequência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em rebanhos bovinos da bacia leiteira de Caparaó, estado do Espírito Santo. **Archives of Veterinary Science**, vol.15, nº. 2, p. 100-106, 2010.

VICTORIA, B.; AHMED, A.; ZUERNER, R. L.; AHMED, N.; BULACH, D. M.; QUINTEIRO, J.; HARTSKEERL, R.A. Conservation of the *S10-SPC-A* Locus within otherwise highly plastic genomes provides phylogenetic insight into the genus *Leptospira*. **PLoS ONE**, vol. 3, nº. 7, p. 9, jul., 2008.

VIEIRA, A. S. **Levantamento de *Leptospira* spp. em animais silvestres do Pantanal sul-mato-grossense por meio de técnicas sorológicas e moleculares.** 2009. 83 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2009.

WENYON, C. M. **Protozoology**, vol. 2. William Wood and Co., New York. 1926.

WHO- World Health Organization. **Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control.** Malta, 2003.

WOLBACH, S. B.; BINGER, C. A. L. Notes on filterable spirochaete from fresh water, *Spirochaeta biflexa* (new species). **J. Med. Res.** p. 3023-26, 1914.

YASUDA, P. H.; STEIGERWALT, A. G.; SULZER, K. R.; KAUFMANN, A. F.; ROGERS, F.; BRENNER, D. J. Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with proposals for seven new *Leptospira* species. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, vol. 37, nº. 4, p. 407-415, 1987.

YENER, Z.; KELES, H. Immunoperoxidase and histopathological examinations of leptospiral nephritis in cattle. **Journal of Veterinary Medicine**, vol. 48, nº. 7, p. 441 – 447, may., 2001.

ZACARIAS, F.G.S.; VASCONCELLOS, S.A.; ANZAI, E.K. et al. Isolation of leptospira serovars Canicola and Copenhageni from cattle urine in the state of Paraná, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, vol. 39, nº. 4, p. 744–748, dec., 2008.

ZUERNER, R. L.; ELLIS, W. A.; BOLIN, C. A.; MONTGOMERY, J. M. Restriction fragment length polymorphisms *distinguish Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo type Hardjo-bovis isolates from diferente geographical locations. **J. Clin. Microbiol**, vol. 31, nº. 3, p. 578-583, mar., 1993.