

Gênero *Leptospira* spp
FAVET - UFRGS
Prof. Marcos JP Gomes
2015

Gênero *Leptospira* spp

ETIMOLOGIA: Gr. adj. *leptos*, fino estreito; L. fem. n. *spira*, espiral, hélice N.L. fem. n. *Leptospira*, uma espiral ou hélice fina, referindo à morfologia de bactéria.

ATUALIDADES

A antiga *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* (LPSN) foi mantida pelo pesquisador JP Euzeby, mas atualmente (2015) é mantido pelo Aidan C. Parte, Curator, LPSN-bacterio.net onde há citação de 23 espécies e nenhuma subespécie no gênero *Leptospira* spp. Dentre essas 16 espécies, há, pelo menos, mais quatro genomoespécies que foram incluídas como espécie no ano de 2013, conforme o site <http://www.bacterio.net/leptospira.html>

As análises filogenéticas dos genes 16S rRNA sugerem que as diferentes espécies do gênero *Leptospira* agrupam-se em três grupos designados: patogênico, saprófitas e intermediário.

O Grupo 1- São 12 espécies: *L. borgpetersenii*, *L. broomii*, *L. fainei*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. licerasiae*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. weilii*, *L. wolffii*, *L. kirschneri* e *L. kmetyi* que possuem sorovares patogênicos.

Grupo 2- *L. meyeri* possui sorovares saprófitas e sorovares patogênicos.

Grupo 3- *L. alexanderi* possui sorovares saprófitas e outros desconhecidos.

Grupo 4- *L. biflexa* e *L. wolbachii* contem cepas saprófitas.

Recentemente, houve inclusão de mais quatro espécies novas, incluindo:

Genomoespécie 1→ *Leptospira alstonii*. Genomoespécie 3→ *Leptospira vanthielii*

Genomoespécie 4→ *Leptospira terpstrae*. Genomoespécie 5→ *Leptospira yanagawae*

Atualmente são organizadas assim:

1-*L. idonii* (Saito et al. 2013).

2-*L. alexanderi* (Brenner et al. 1999).

3-*L. biflexa* (Wolbach and Binger 1914) Noguchi 1918,

4-*L. borgpetersenii* (Yasuda et al. 1987).

Gênero *Leptospira* spp
FAVET - UFRGS
Prof. Marcos JP Gomes
2015

- 5-*L. broomii* (Levett et al. 2006).
- 6-*L. fainei* (Perolat et al. 1998).
- 7-*L. inadai* (Yasuda et al. 1987).
- 8-*L. interrogans* (Stimson 1907) Wenyon 1926, (espécie Tipo do gênero).
- 9-*L. kirschneri* (Ramadass et al. 1992).
- 10-*L. kmetyi* (Slack et al. 2009).
- 11-*L. licerasiae* (Matthias et al. 2009).
- 12-*Leptospira mayottensis* Bourhy et al. 2014, sp. nov.
- 13-*L. meyeri* (Yasuda et al. 1987).
- 14-*L. noguchii* (Yasuda et al. 1987).
- 15-*L. santarosai* (Yasuda et al. 1987).
- 16-*L. vanthielii* (Smythe et al. 2013).
- 17-*L. weilii* (Yasuda et al. 1987).
- 18-*L. wolbachii* (Yasuda et al. 1987).
- 19-*L. wolffii* (Slack et al. 2008).
- 20-*L. alstonii* (Smythe et al. 2013).
- 21-*L. terpstrae* (Smythe et al. 2013).
- 22-*L. yanagawae* (Smythe et al. 2013).

HISTÓRICO

Em 1881, em Praga, o Dr. Adolf Weiss descreveu uma doença denominada "*icterus catarrhalis*" que no futuro seria a doença de Weil.

Adolf Weil, em (1882; 1886), fez a primeira descrição de uma doença observada em duas ocasiões, envolvendo quatro pacientes, em 1870. Os sinais clínicos eram semelhantes e particulares nestes quatro pacientes. A doença era caracterizada pela icterícia severa, febre e hemorragia com envolvimento renal.

Há relatos que sustentam que a leptospirose era reconhecida, em 1883, como uma doença ocupacional de trabalhadores de esgotos.

Globig, em 1890, descreveu a "*Badeepidemie*", uma doença que mostrou grande diferença quando comparada à doença de Weil.

Em 1891, F. Muller descreveu a "*Schlamfieberepidemie*", em Schleisen, uma doença com sinais e sintomas semelhantes.

Rimpau e colaboradores descreveram "*Feldfieber*" a qual era o nome que descrevia a leptospirose não ictérica.

A leptospirose era conhecida com diferentes nomes, incluindo "Tifo bilioso" por Weil. Outros a chamavam de Doença de Weil ou icterícia infecciosa.

O agente foi isolado, pela primeira vez, no Japão, em 1915, por Inada e Ito. Os japoneses isolaram leptospirosas de trabalhadores em minas, denominando "*Spirochaeta icterohaemorrhagiae*".

Em 1915, Uhlenhut e Fromme, provaram a existência do agente etiológico, inoculando sangue de soldados suspeitos de doença de Weil, em cobaias. Os animais inoculados morreram e leptospirosas foram microscopicamente identificadas, sendo chamada de "*Spirochaeta icterohaemorrhagiae*".

Em 1917, Miyajima e colaboradores, demonstraram que ratos eram possíveis carreadores de leptospirosas, mostrando que 40% deles eram portadores renais.

No Brasil, os primeiros trabalhos sobre a leptospirose foram realizados em 1818, no Rio de Janeiro por Aragão e em São Paulo por Carini.

Em 1930, foi identificado o primeiro caso de leptospirose humana ocorrido na cidade de São Paulo.

Em 1940, no Rio de Janeiro, cães com manifestações clínicas compatíveis com leptospirose foram submetidos à necropsia para confirmar a presença do agente causador da leptospirose em cães no Brasil.

Em 1942, houve a descrição de surtos epidêmicos em Porto Alegre por Costa e colaboradores e em 1946, no Paraná por Miranda.

A partir de 1947, o Dr. Helio Gustavo Guida, no Instituto Biológico de São Paulo investigando as leptospiroses animais, possibilitou o levantamento de diferentes espécies como possíveis fontes de infecção, reavaliando sua importância na patologia humana.

Em 1954, descreveu-se um caso de febre humana, relacionando o sorovar Canícola ao contato com os cães, que seriam infectados por esse agente (Brasil, 1997; Versonese, 1985; Brod et al., 2005)

A leptospirose é classificada como uma antropozoonose direta que ocorre mundialmente de forma endêmica. Ela é causada por espécies de espiroquetas do gênero *Leptospira* e considerada, nos últimos anos, como uma doença emergente que afeta diversas espécies de animais domésticos/silvestres e o homem (McBride et al., 2005).

No Brasil, foram reconhecidos alguns surtos como os ocorridos em Recife nos anos de 1970 (Corrêia et al., 1972) e 1975 (Oliveira et al., 1977); em São Paulo nos anos de 1991 e 1995; em Santa Catarina no ano de 1995 e no Rio de Janeiro em 1996 (Brasil, 1997). O ambiente urbano onde ocorreram os surtos caracterizou-se por ser propício à proliferação de roedores e as altas precipitações pluviométricas estiveram sempre ligadas à origem das epidemias de leptospirose.

TAXONOMIA

O gênero *Leptospira* é um dos gêneros da família *Leptospiraceae* da ordem *Spirochaetales*. A comparação das sequências de ARN ribossomais confirmaram os resultados dos estudos fenotípicos que o gênero *Leptospira*, constitui um grupo distinto dentro da ordem *Spirochaetales*. O gênero *Leptospira*, antes de outubro de 1987, possuía três espécies:

- a) *Leptospira interrogans* incluía as cepas patogênicas para os animais e o homem;
- b) *Leptospira biflexa* era agrupadas por cepas não patogênicas isoladas da água, da lama e, às vezes, do animal e do homem.
- c) *Leptospira parva* incluía espécies não patogênicas isoladas da água, de uma amostra de albumina bovina e do útero de uma porca.

Além dos critérios de patogenicidade, as espécies do gênero *Leptospira* foram organizadas por algumas características fenotípicas:

- 1- *Leptospira interrogans* possuem formas esféricas quando as células são colocadas por 2 horas em uma solução de NaCl (1 M) a 20-30° C; não crescem a 13° C e não crescem na presença de 8-azaguanina (225 mg / mL).
- 2- *Leptospira biflexa* não possuem formas

esféricas quando as células são colocadas por 2 horas em uma solução de NaCl (1 M) a 20-30 ° C, cultivadas a 13 ° C na presença de 8 azaguanina.3- *Leptospira parva* são cultivadas a 13° C, mas não na presença de 8 azaguanina.

Tanto a *Leptospira interrogans* e *Leptospira biflexa* foram, de fato, definidas taxonomicamente, tendo como base algumas características especiais. A *Leptospira parva* possui traços fenotípicos específicos e estudos de hibridação ADN-ADN confirmaram a validade desta taxonomia. Em 11 de julho de 2005, esta espécie foi reclassificada em um novo gênero (*Turneriella*) com o nome de *Turneriella parva*.

Em outubro de 1987, os estudos de hibridação ADN-ADN modificaram de maneira radical a taxonomia das *Leptospira*, mostraram a existência de pelo menos, 5 novas espécies genéticas dentro da espécie *L. interrogans* e de pelo menos 2 (genomoespécies) novas espécies genéticas na espécie *L. biflexa*.

Esta classificação genômica é apoiada pelas características fenotípicas (pequeno número e difícil de identificar), de modo que Yasuda e colaboradores propôs 7 novas espécies: *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. meyeri*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. weilii* e *L. wolbachii*.

Em 1992, Ramadass e colaboradores descreveram a espécie *L. kirschneri*. Em 1998, Pérolat e colaboradores propuseram a espécie *L. fainei*. Em 1999, Brenner e colaboradores validaram a nomenclatura de *L. alexanderi*. Em 2006, Levett e equipe descreveram a *L. broomii*. Em 2008, Slack e seu grupo validaram a classificação da *L. wolffii*. Em janeiro de 2009, Matthias e seu time validaram a *L. licerasiae*. Em abril de 2009, Slack e colaboradores validaram a classificação da *L. kmetyi*.

CLASSIFICAÇÃO

O gênero pertence à Ordem: *Spirochaetales* – com os seguintes 14 gêneros: *Borrelia*, *Brachyspira*, *Brevinema*, *Clevelandina*, *Cristispira*, *Diplocalyx*, *Hollandina*, *Leptonema*, *Leptospira*, *Pillotina*, *Serpulina*, *Spirochaeta*, *Treponema* e *Turneriella*.

O gênero *Leptospira* pertence à família *Leptospiraceae*, distribuídas em 3 diferentes gêneros: *Leptospira*, *Leptonema* e *Turneriella*.

Gênero *Leptospira* spp
FAVET - UFRGS
Prof. Marcos JP Gomes
2015

Espiroquetas pertencem à ordem *Spirochaetales* cujos principais gêneros estão distribuídos em importantes gêneros, conforme o Quadro 1 abaixo.

A classificação das espécies do gênero *Leptospira* está baseada no grau de parentesco do ADN. O gênero está dividido em 16 espécies definidas e mais recentemente quatro espécies genéticas foram incluídas como espécies distintas com pelo menos, 70% de parentesco (DNA) e cuja sequência contém uma divergência de, pelo menos, 5% de bases não pareadas. Esta classificação coexiste com a antiga classificação sorológica na qual o antissoro era utilizado para estabelecer parentesco entre as amostras isoladas. As amostras de leptospiros ainda são comumente referidas pelo sorovar. Muitos sorovares estudados são representados por somente uma única cepa referência e, como mais cepas são estudadas, o número de espécies tende a aumentar.

Atualmente, todas as 20 espécies conhecidas do gênero *Leptospira* são classificadas e distribuídas em mais de 24 sorogrupos e em mais de 250 sorovares, tendo como base a expressão do LPS exposto na superfície. As diferenças estruturais na porção de carboidrato do LPS determina a diversidade antigênica entre os numerosos grupos de sorovares. Os sorovares contendo determinantes antigênicos que se sobrepõem são classificados em um sorogrupo maior, segundo Tabela.1

Gênero *Leptospira* spp
 FAVET - UFRGS
 Prof. Marcos JP Gomes
 2015

Quadro1. Características entre os gêneros *Leptospira*, *Serpulina*, *Treponema* e *Borrelia*.

Características	<i>Leptospira</i>	<i>Serpulina</i> / <i>Treponema</i>	<i>Borrelia</i>
Morfologia	Muitas espiras finas e firmes	6-14 Espiras regulares	4-8 Espiras frouxas
Comprimento	6 - 20 µm	5 - 20 µm	3 - 20 µm
Diâmetro celular	0,1 - 0,2µm	0,1 - 0,5µm	0,2 - 0,5µm
Flagelo periplasmático	2	6 - 10	15 – 20
Discos de inserção	3 - 5	1	2
AA do peptidioglicano	Ác. Diaminopimélico	Ornitina	Ornitina
Respiração	Aeróbia	Microaer. ou anaeróbico	Microaer.
Prod. catalase	Presente	Ausente	Ausente
Fonte de energia	Ác. graxo de cadeia longa	Carboidrato e/ou aminoácido	Carboidrato
Trans. artrópodes	Não	Não	Sim
Enfermidade	Leptospiroses	Sífilis, pinta, caratê,	Febre recidivante, Lyme

TABELA 1. Sorogrupos e alguns sorovares das *L. interrogans* sensu lato

Sorogrupo	Sorovar(es)
1-Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae, copenhageni, lai, zimbabwe
2-Hebdomadis	hebdomadis, jules, kremastos
3-Autumnalis	autumnalis, fortbragg, bim, weersinghe
4-Pyrogenes	pyrogenes
5-Bataviae	bataviae
6-Grippotyphosa	grippotyphosa, canalzonae, ratnapura
7-Canicola	canicola
8-Australis	australis, bratislava, lora
9-Pomona	pomona
10-Javanica	javanica
11-Sejroe	sejroe, saxkoebing, hardjo
12-Panama	panama, mangus
13-Cynopteri	cynopteri
14-Djasiman	djasiman
15-Sarmin	sarmin
16-Mini	mini, georgia
17-Tarassovi	tarassovi
18-Ballum	ballum, aroborea
19-Celledoni	celledoni
20-Louisiana	louisiana, lanka
21-Ranarum	ranarum
22-Manhao	manhao
23-Shermani	shermani
24-Hurstbridge	hurstbridge

CARACTERÍSTICAS GERAIS

As leptospiros possuem todas as características da ordem *Spirochaetales* e da família *Leptospiraceae*. São bactérias com 0,1 a 0,2 µm de diâmetro (microscopia de campo escuro é essencial para a observação) e 6-12 µm de comprimento; forma fina e espiralada; apresentam extremidades com ganchos; móveis graças a dois flagelos (um em cada pólo da célula), que não se sobrepõem no centro da célula; aeróbicas estritas; catalase positivas; oxidases negativas; quimiorganotróficas; capazes de utilizar os ácidos graxos de cadeia longa como a única fonte de carbono e energia; incapazes de metabolizar os açúcares; não necessitam de aminoácidos para o crescimento. As leptospiros não incorporam bases de pirimidina e à adição de 5-fluorouracila (100 mg / mL) foi utilizada como meio de cultivo parcialmente seletivo.

As leptospiros têm estruturas de superfície que compartilham características tanto de bactérias Gram-positivas e negativas. A membrana dupla e a presença de LPS são características de bactérias Gram-negativas, enquanto que a associação íntima da membrana citoplasmática com a mureína da parede celular é remanescente da arquitetura das bactérias Gram-positivas (Alexander et al. 1963, Alexander et al. 1972; Adler et al. 1983).

As leptospiros possuem a mesma estrutura de parede celular das bactérias Gram negativas típicas, mas com a camada de peptidoglicano aderido a membrana citoplasmática interna e sobreposto pela membrana externa. Esta propriedade tem facilitado a purificação da membrana externa pela extração com detergente comum. Dentro da membrana externa, o LPS, constitui o principal antígeno e o principal componente de superfície. Ela é estrutural e imunologicamente semelhantes ao LPS das outras bactérias Gram negativas, mas é muito menos tóxica, na maioria dos testes da atividade endotóxica. Ela é 12 vezes menos letal para camundongos quando comparado ao LPS da *E. coli*.

Gênero *Leptospira* spp
 FAVET - UFRGS
 Prof. Marcos JP Gomes
 2015

Quadro 2. Características diferenciais entre as espécies do gênero *Leptospira*

	Cultivo 11° C	Cultivo 30° C	Cultivo 37° C	Cultivo 8- azaguanina*	Cultivo 2,6-di- aminopurina**	Cultivo sulfato cobre***	Lipase****
<i>L. alexanderi</i>	-	+	-	-	-	d	d
<i>L. biflexa</i>	-	+	d	d	d	d	+
<i>L. borgpetersenii</i>	-	+	-	-	d	-	-
<i>L. broomii</i>		+					
<i>L. fainei</i>	-	+		+/-			
<i>L. inadai</i>	d	+	d	d	d	d	D
<i>L. interrogans</i>	-	+	-	-	d	-	D
<i>L. kirschneri</i>	-	+	-	-	-	d	D
<i>L. mayottensis</i>							
<i>L. licerasiae</i>		+		-			
<i>L. meyeri</i>	-	+	+	+	+	+	+
<i>L. noguchii</i>	-	+	-	-	d	-	D
<i>L. santarosai</i>	-	+	-	-	d	-	-
<i>L. weilii</i>	-	+	-	-	d	d	-
<i>L. wolbachii</i>	-	+	-	d	-	d	+
<i>L. wolfii</i>	-	+	+	+			
<i>L. alstonii</i>	-	+	-	-	-	-	-
<i>L. terpstrae</i>	-	+	-	-	-	-	-
<i>L. vanthielii</i>	-	+	-	+	-	+	-
<i>L. yanagawae</i>	-	+	-	+	-	+	-

* : 225 mg / mL.

** : 10 mg / mL.

*** : 100 mg / mL.

**** : Pesquisa efetuada segundo a técnica de Johnson e Harris.

Estudos genéticos de algumas linhagens revelaram as seguintes características:

1- O genoma é composto de dois cromossomos circulares, um de 3.850 a 5.450 kb e outro de 350 kb. Este último contém um gene *asd* que codifica a enzima “aspartato β semi aldeído desidrogenase”, essencial na biossíntese de aminoácidos e parede celular, sendo qualificado como pequeno cromossomo.

2- Os genes codificantes para o RNAr são originais, tanto por seu número e organização em comparação à outras bactérias como a *E. coli*, Na verdade, eles são poucos (2 cópias do gene *rrs* (codifica para rRNA 16S); 2 cópias do gene *rpl* (codifica para rRNA 23S) e uma cópia do gene *rrf* (codifica rRNA 5S) e distribuídos separadamente no cromossomo.

A composição antigênica das cepas de leptospiros usadas como propósitos taxonômicos abaixo da espécie é o sorovar. O método padrão para determinação do sorovar é a aglutinação microscópica com absorção de aglutininas cruzadas. Por conveniência, os sorovares relacionados antigenicamente foram organizados em sorogrupos.

As leptospiros patogênicas estão distribuídas em 23 sorogrupos e aproximadamente 260 sorovares ou sorotipos. A determinação do sorogrupo e/ou sorovar de uma amostra isolada requer muita experiência, sendo realizado em laboratórios especializados ou de referência.

As leptospiros desenvolveram uma relação eficiente com o hospedeiro, havendo, algumas vezes, infecções latentes sem evidência clínicas de sua presença. As doenças resultantes de infecções por leptospiros variam entre formas fulminantes que resultam em morte e a forma passiva sem sinais clínicos visíveis.

As leptospiros são espiroquetas uniformes quanto ao aspecto morfológico e fisiológico, mas diferem quanto ao aspecto sorológico e epidemiológico.

CARACTERÍSTICAS MORFOTINTORIAIS

São fracamente coradas pelos corantes anilínicos. As células não coradas são visíveis pela microscopia de contraste ou pela microscopia de campo escuro. A conformação helicoidal é para o lado direito (molas de relógio), Possuem em uma ou nas duas extremidades ganchos típicos. Há dois flagelos periplasmáticos (fibrila axial e endoflagelo) que ocorre em cada extremidade, mas raramente se sobrepõe na região central.

No meio líquido, possui movimentos característicos com rotação alternada ao longo do eixo e translação em direção à extremidade sem gancho. No meio mais viscoso são observados movimentos de serpenteio e rolamento sinuosos.

Colônias difusas são formadas abaixo da superfície do meio com 1% de agar e colônias turvas em meio com agar a 2%. Temperatura ótima é de 28-30° C.

O gênero é quimiorganotrófico, utilizando ácidos graxos ou alcoóis graxos, possuindo 15 ou mais átomos de carbono como fonte de energia. Não utiliza carboidratos ou aminoácidos como fonte de energia. Soro ou albumina sérica é necessário para o crescimento. O gênero não cresce em TSB sem adição de soro ou albumina. São oxidase e catalase positivas. São resistentes à ação inibitória do 5-fluorouracila. O lipídio celular não contém glicolipídios. O ácido diaminopimélico presente no peptidoglicano é alfa, épsilon diaminopimélico.

As leptospiras são aeróbias; bioquimicamente inativas; multiplicam-se melhor a temperatura, em torno de 26-30° C e pH 7,2 e 7,4. Podem atravessar membranas filtrantes de 0,45 µm de diâmetro. O cultivo de leptospiras é longo e difícil. O tempo de geração é de 4 a 5 horas para os sorovares saprófitas e de 8 a 12 horas para os sorovares patogênicos. Utilizam ácidos graxos de cadeia longa, geralmente obtidos dos tweens; vitaminas B1 e B12; ferro ferroso e íons de amônio como fonte de nitrogênio.

As leptospiras são cultivadas em meios artificiais, contendo 10% de soro de coelho ou 1% de albumina sérica bovina com adição de ácidos graxos de cadeia longa e pH 6,8-7,4; A temperatura ótima para seu crescimento está entre 28°- 30° C; são catalase e oxidase positiva.

O crescimento é avaliado pela observação dos cultivos ao microscópio de campo escuro. Os cultivos devem ser checados para a presença de contaminantes, após 3–4 dias e subcultivadas após 7–21 dias, embora elas possam sobreviver em cultivo líquido (deixado parado) por meses e, algumas vezes, por anos.

Os meios tornam-se seletivos pela adição de vários antimicrobianos, sendo os mais comuns: 5-fluoruracila e sulfato de neomicina, embora polimixina B, rifampicina e vancomicina possam ser utilizadas.

O meio utilizado é o tween-albumina ou meio EMJH (Ellinghausen-McCullough modificado por Johnson e Harris) que é comercializado. O EMJH adiciona 1% de albumina sérica bovina e tween 80 (fonte de ácidos graxos de cadeia longa); formulações comerciais estão disponíveis no comércio. Meios líquidos e semissólidos, contendo soro incluem: o meio de Korthof (Peptona, NaCl, NaHCO₃, KCl, CaCl₂, KH₂PO₄, Na₂HPO₄) e Fletcher (Peptona, extrato de carne, NaCl, e agar).

O crescimento das leptospiros é lento no isolamento primário e esses cultivos devem ser mantidos durante, pelo menos, 13 semanas antes de serem descartados. Algumas cepas são muito lentas e podem exigir ainda mais tempo de incubação. Agar deve/pode ser adicionado, em baixas concentrações (0,1-0,2%). O crescimento no cultivo semissólido atinge uma concentração numa zona abaixo da superfície do meio, que se torna cada vez mais turva com a incubação. Este crescimento está relacionado com a tensão de oxigênio ideal que é conhecido como um anel de Dinger ou disco. Os cultivos geralmente podem ser mantidos por repetidos subcultivos ou estocagem em meio semissólido, contendo hemoglobina. Entretanto, é aconselhada a manutenção das linhagens em nitrogênio líquido, tanto pela produção de vacinas ou em estudos experimentais que requerem a manutenção da virulência.

RESISTÊNCIA

No ambiente externo, as leptospiros patogênicas não se multiplicam, mas elas sobrevivem na água ou no solo lamacento para pH levemente alcalino, com salinidade baixa e na ausência de radiação ultravioleta (sorotipos patogênicos 3-5 vezes mais sensível

à radiação UV do que sorovares saprófitas). Esta sobrevivência pode chegar a até seis meses.

As leptospirosas são pouco resistentes; são rapidamente destruídas pela desidratação. Temperaturas entre 50-60 °C as destroem, em pouco tempo. A resistência aos desinfetantes químicos não é grande; são muito sensíveis ao pH ácido; são destruídas pelo suco gástrico em 30 minutos; são inibidas em pH abaixo de 6,0 ou acima de 8,0 e temperatura abaixo de 10°C ou acima de 36°C.

HABITAT

Os sorovares patogênicos alojam-se nos animais hospedeiros, doentes ou não, especialmente nos túbulos renais e no trato genital. O hospedeiro do agente é variável, segundo os sorovares:

- L. Icterohaemorrhagiae* para os ratos (*Rattus norvegicus*);
- L. Grippityphosa* para ratazanas;
- L. Canicola* para os caninos;
- L. Hardjobovis* para bovinos e ovinos;
- L. Pomona* para porcos, javalis, bem como bovinos (América do Norte).
- L. Bratislava* para equinos e suínos.

Esta especificidade do hospedeiro não é sorovar exclusiva e muitos animais podem ser hospedeiros de vários sorovares.

Os animais portadores perpetuam a infecção aos seus descendentes pela transmissão direta (via genital, via transplacentária, aleitamento materno); podem infectar o homem pelo contato direto e contaminam outras espécies animais e o homem, por via indireta (contato com o ambiente externo, principalmente contaminado pela urina de animais infectados).

O habitat das leptospirosas inclui: água estagnada, solo úmido, matéria orgânica em decomposição, plantas, animais e o homem. As leptospirosas são inativas bioquimicamente. Animais de vida livre no solo, água doce ou do mar, vivendo em associação com hospedeiros. As amostras não saprófitas causam leptospirose, primariamente infectando

animais domésticos e silvestres os quais atuam como reservatórios. O homem pode contrair leptospirose como hospedeiro acidental. As leptospirose e leptospirose ocorrem em todo o mundo.

A Leptospirose foi evidenciada em muitas espécies de mamíferos, incluindo o homem. No entanto, ela não parece existir nas aves e mesmo experimentalmente, foi impossível infectar aves adultas. A infecção de peixes, anfíbios, répteis e invertebrados aquáticos, quase não são documentados, entretanto alguns sorovares como Pingchang, Sichuan e Ranarum foram isolados de rãs saudáveis.

EPIZOOTIOLOGIA

Os mecanismos pelos quais as leptospirose danificam os tecidos dos hospedeiros não estão bem definidos. A base molecular da virulência ainda é pouco compreendida, principalmente devido à ausência de ferramentas genéticas para a manipulação de leptospirose. Há relatos, mas em quase todos os casos, o componente específico responsável pela atividade investigada não foi identificada.

Leptospirose patogênicas e não patogênicas se aderem às células epiteliais tubulares renais cultivadas, mas a adesina não foi identificada. As leptospirose, durante a fase de leptospirose tentam evitar a destruição mediada pelo complemento. A capacidade das leptospirose patogênicas em resistir à via alternativa do complemento foi considerada como um fator de virulência, embora o mecanismo exato subjacente a essa resistência não tenha sido definida. As leptospirose patogênicas interagem com muitos componentes da matriz extracelular do hospedeiro e algumas adesinas que facilitam a invasão e colonização. A *L. interrogans* é bastante resistente à ativação da via alternativa do complemento que está associado à ligação do fator H à membrana externa bacteriana; a degradação da convertase C3 e C3b e inibição à formação do complexo de ataque de membranas.

A *L. interrogans*, após a entrada no hospedeiro, através da pele ou mucosas, é exposta ao sistema inato de defesa celular e humoral que geralmente desarmam e removem as cepas invasoras menos virulentas. A infecção inicial é seguida pela bacteremia que persiste por um período de incubação de 1 a 2 semanas, após o início da doença aguda. A multiplicação

nos hospedeiros suscetíveis é rápida, com o tempo de geração entre 8 a 16 horas e menor nas cepas virulentas que causam doença aguda fulminante.

A lesão primária é devido ao dano ao endotélio vascular, particularmente dos pequenos vasos sanguíneos, levando à isquemia localizada e resultando em necrose tubular renal, lesão hepato-pulmonar, meningite, miosite e placentite. A ativação do processo de coagulação em cascata é um achado frequentes na leptospirose humana, resultando em coagulação intravascular disseminada. Ela ocorre na infecção aguda de animais suscetíveis. Qualquer órgão pode ser atingido na leptospirose aguda, assim como hemorragias e icterícia são comuns nos casos graves. As leptospiras são removidas da circulação e dos tecidos por opsonofagocitose, após o aparecimento de anticorpos circulantes. A lesão tecidual pode tornar-se reversível e ser seguida pela reparação (rim, fígado), mesmo que o dano tenha longa duração, ela pode cicatrizar. Estas lesões podem ser visualizadas macroscopicamente, especialmente nos rins de suínos e caninos, onde são conhecidas como “manchas brancas”.

Não há evidências para a secreção de exotoxinas nas leptospiras. A lesão endotelial no rim de cobaias experimentalmente infectadas foi associada à presença de leptospiras intactas ou seus componentes, sugerindo o envolvimento direto de componentes celulares e/ou toxinas ligadas às leptospiras. Capacidade de invasão das linhagens Vero e J774A.1 e indução de apoptose em macrófagos (Linhagem J774A.1) foram associadas à virulência. Essas duas propriedades são perdidas rapidamente quando subcultivadas “*in vitro*”. Uma proteína ligante à fibronectina de 36 kDa foi identificada na *L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae, mas ausente na variante avirulenta isogênica e de outra cepa saprófita.

O LPS do gênero *Leptospira* assemelha-se tanto quimicamente quanto imunologicamente ao LPS das outras bactérias GN, mas possui algumas características incomuns. As leptospiras patogênicas possuem LPS, glicolipídios e lipoproteínas, estruturas que determinam a virulência e o alvo principal da imunidade. A endotoxina derivada da membrana externa de leptospiras patogênicas pode ser o possível mecanismo para a patogenia da leptospirose e foco da pesquisa no assunto. O LPS é muito menos ativo

nos testes padrão para a atividade da endotoxina, tais como o teste da pirogenicidade em coelhos, mortalidade em camundongos, reação de Schwartzman (Reações tóxicas às endotoxinas bacterianas em que ocorre coagulação intravascular local ou sistêmica) e mitogenicidade de células B. Se esta atividade reduzida é devido a algumas das propriedades do lipídio A, ela ainda permanece desconhecida.

Constituintes da membrana externa da *L. interrogans* ativa macrófagos, através do CD14 e “*Toll-like receptor 2*” (TLR2), mas não o TLR4, um componente para o reconhecimento do LPS de bactérias GN na resposta celular. Seria o LPS e não a lipoproteína o componente predominante na sinalização de macrófagos pela via TLR2. O receptor TLR2 é predominante nas células humanas enquanto que tanto o TLR2 e TLR4 são os receptores nas células de camundongo. É possível que esta diferença possa explicar, em parte, o fato que camundongos e ratos sobrevivam a infecção aguda e tornem-se portadores renais por toda a vida. Entretanto não há informações sobre os receptores TLR em outras espécies animais.

A resposta do hospedeiro na leptospirose, como em todas as infecções tem um papel no resultado da infecção.

Hamsters infectados experimentalmente expressam citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-4 e IL-10 em resposta à infecção pela *L. interrogans* 1 a 4 dias pós-infecção. Em hamsters imunizados com bacterina contra *L. interrogans* sorovar Autumnalis, os níveis de γ -IFN e α -TNF estão correlacionados com a gravidade da infecção e da patologia pulmonar. As bacterinas comerciais não impedem a patologia dos imunizados ou impedem a colonização do rim e eliminação pela urina. O agente pode persistir e causar reinfecção de tempos em tempos mesmo em rebanhos imunizados. A infecção de camundongos com receptores deficientes para α -TNF resultou em grave inflamação renal, sugerindo que o α -TNF é importante no controle da infecção precoce. Não houve diferença observada em camundongos com deficiência para IL-4. É difícil acessar a atividade pro-inflamatória frente às proteínas da membrana das leptospiros por causa do efeito de pequenas quantidades de LPS em preparações com Triton X-114 que podem não ser completamente excluídas.

A atividade hemolítica tem sido relatada em vários sorovares. Muitas espécies de *Leptospira* contem uma série de genes que codificam a produção de esfingomielinases celulares ou extracelulares, incluindo pelo menos sete genes “*sphA*–like” dentre as leptospiros patogênicas, incluindo a hemolisina SphH formadora de poros. A importância de outras esfingomielinases Sph na patogênese não foi determinada experimentalmente, mas as sequências genômicas de leptospiros patogênicos e saprófitos com o desenvolvimento de sistemas de mutagenese permitiram uma investigação dos mecanismos genéticos (celular e molecular) na patogênese da leptospirose. A ausência de genes para esfingomielinase na *L. biflexa* contribuiu para o papel na patogenia dessas enzimas assim como na obtenção de nutrientes no ambiente.

O primeiro fator de virulência genético reconhecido no gênero *Leptospira* foi a lipoproteína de superfície Loa22. Uma mutante dessa lipoproteína (*loa22*) foi atenuada em cobaias e hamsters e utilizadas como modelos de leptospirose aguda. A função do Loa22 permanece desconhecida, mas uma homóloga da Loa22 foi encontrada na *L. biflexa*. O seu papel na virulência pode ser indireto ou talvez ajudando a estabilizar a membrana externa das leptospiros.

Ferro é essencial para o crescimento leptospiros (saprófitos e patogênicos) que são capazes de utilizar várias fontes de ferro, incluindo sais de ferro ferroso e de sais férrico, mas não lactoferrinas. A análise genômica não mostrou evidências de síntese ou secreção de siderófilos, mas identificaram vários genes que codificam proteínas similares aos receptores TonB dependentes, uma via comum para aquisição e transporte de ferro em bactérias GN. A fonte mais abundante de ferro é o grupo heme ou proteínas contendo o grupo heme. Duas proteínas ligadas a heme foram descritas em leptospiros patogênicos, incluindo uma proteína com 44 kDa identificada como LipL41. Entretanto, a sua presença é alegada na *L. biflexa* (baseada na produção de anticorpos), mas não é alegada pela sequência genômica.

O gene *hemO* que codifica a enzima hemeoxigenase foi mostrada ser essencial para o gênero *Leptospira* obter ferro da hemoglobina. A importância de heme como ferro “*in vivo*” não surpreende já que o gene *hemO* possui um papel na virulência embora não seja

essencial. Hamsters quando infectados com o gene mutante *hemO* mostraram um aumento da sobrevivência com redução ou eliminação de alterações patológicas, mas leptospirosas foram isoladas da urina corroborando com a noção de que enquanto o grupo heme é a maior fonte de ferro “*in vivo*”, algum crescimento no tecido do hospedeiro pode ser mediado por outras fontes menos abundantes.

Há um conjunto de seis proteínas de superfície, denominadas Len-ABCDEF, que possui semelhança estrutural e funcional para endostatina dos mamíferos e que se ligam tanto ao fator H regulador do Complemento quanto à laminina do hospedeiro. Todas as proteínas de superfície, exceto LenA ligam-se à fibronectina. É surpreendente que a inativação, tanto a LenB ou LenE não tenha efeito sobre a virulência para hamsters. A importância e papel dessas proteínas de superfície na patogenia ainda permanecem indefinidos.

A principal proteína de superfície é a LipL32 que liga-se tanto à laminina, ao colágeno e à fibronectina do hospedeiro. A estrutura cristalizada da LipL32 foi recentemente obtida. A LipL32 mostrou homologia estrutural às adesinas que ligam-se à componentes da matriz extracelular, corroborando com os dados experimentais que demonstraram função semelhantes da LipL32. A LipL32 é exclusiva e altamente conservada entre as leptospirosas patogênicas. Entretanto ela não é necessária, tanto na leptospirose aguda do hamster quanto na colonização do rim em ratos. Uma mutante da LipL32 mostrou um fenótipo normal de virulência na leptospirose aguda ou crônica, assim como crescimento normal “*in vitro*” e sobrevivência na água. O papel desta proteína enigmática na patogenia permanece desconhecido. Resultado semelhante foi relatado para as proteínas Lig expostas na superfície. Elas estão presentes somente em espécies patogênicas e essa expressão é perdida pelo subcultivos sucessivos com perda de virulência. Tanto LigA quanto a LigB ligam-se à fibronectina e sua expressão é regulada pela osmolaridade fisiológica. Entretanto, a inativação da LigB não afetou a virulência para hamsters nem na colonização renal de ratos. Os resultados dos estudos indicaram um alto grau de redundância com as proteínas envolvidas na adesão, sobrevivência “*in vivo*” e

colonização renal, sugerindo que pode ser difícil identificar e definir os fatores de virulência com a estratégia de inativação de um único gene.

As infecções crônicas nos animais, geralmente são mais comuns do que aguda ou subaguda e a maioria das infecções é assintomática.

A forma aguda é caracterizada por septicemia, hepatite, nefrite e hemoglobinúria.

Nas formas subagudas, os sinais clínicos são menos intensos e os abortos são freqüentes.

Nas formas crônicas, o quadro clínico é dominado por abortos, nefrite intersticial e em algumas espécies de infertilidade e uveíte.

Nos cães, o quadro de leptospirose possui três formas clínicas, incluindo: a) a forma septicêmica; b) a forma hepática e c) a forma renal. Estas formas podem ocorrer nos bovinos e suínos, entretanto a forma septicêmica está mais restrita aos animais jovens e o aborto está mais relacionado com a leptospirose nos animais adultos. Outras espécies de hospedeiros são sensíveis à infecção, apresentando sinais clínicos com menor freqüência.

A maioria das infecções possui curso assintomático. As infecções clínicas estão presentes em caninos, bovinos e em suínos. Menos freqüentes em eqüinos, caprinos e raramente nos gatos.

A leptospirose é caracterizada clinicamente em duas fases distintas:

I) Leptospiremia (febre por aproximadamente sete dias);

II) Leptospirúria (pode persistir por 2 a 3 meses).

O agente pode ser isolado do sangue, na primeira fase (leptospiremia), e do rim e urina (leptospirúria), durante a segunda fase.

A leptospirose pode ser transmitida de animal para animal e para o homem. Ratos e animais silvestres são portadores de *Leptospira* spp.

Nos roedores e marsupiais, as leptospirosas localizam-se nos túbulos renais, podendo ser eliminadas vivas, através da urina por várias semanas; podem infectar outros animais domésticos ou o homem. A doença possui um componente econômico importante por prejuízos diretos e indiretos sobre a produção animal.

Gênero *Leptospira* spp
 FAVET - UFRGS
 Prof. Marcos JP Gomes
 2015

O homem pode se infectar pelo contato direto (animais de estimação, exposição direta aos fluidos e secreções animais, trabalhos em granjas ou matadouros) ou indiretamente, através do ambiente (água, solo).

A fonte de infecção é o animal infectado que contamina o pasto, água e concentrado, através da urina, secreções uterinas e fetos abortados.

Quadro 3. Principais espécies e seus sorovares nas leptospiroses animais.

	Espécie(s)	Sorotipo(s)	Hospedeiro primário
Bovinos	<i>interrogans</i>	Pomona	suínos
	<i>borgpetersenii</i>	Hardjobovis	bovinos
	<i>kirschnerii</i>	Grippotyphosa	suínos
	<i>interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	roedores
	<i>interrogans</i>	Canicola	caninos
	<i>interrogans</i>	Wolffi Szwajizak Balcanica	
Ovinos	<i>interrogans</i>	Pomona	suínos
Caprinos	<i>interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	roedores
	<i>interrogans</i>	Canicola	caninos
	<i>interrogans</i>	Pomona	suínos
Suínos	<i>interrogans</i>	Pomona	suínos
	<i>kirschnerii</i>	Grippotyphosa	suínos
	<i>interrogans</i>	Canicola	caninos
	<i>interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae Bratislava	roedores suínos e eqüinos
Eqüinos	<i>interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	roedores
	<i>interrogans</i>	Pomona Pyrogenes Casteloni	suínos
	<i>borgpetersenii</i>	Hardjobovis	bovinos
Caninos	<i>interrogans</i>	Canicola	
Suínos	<i>interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	roedores
	<i>interrogans</i>	Pomona	suínos

Nos caninos, há quatro síndromes reconhecidas que incluindo: a) hemorrágica aguda; b) ictérica; c) subaguda ou urêmica e d) a forma inaparente. As primeiras duas formas são causadas primariamente, pela *Leptospira* Icterohaemorrhagiae enquanto que as duas

últimas são causadas pela *L. Canicola*. Os estágios iniciais da doença nestas formas são clinicamente indistinguíveis; elas são caracterizadas por: depressão, anorexia, vômitos e diarreia ou constipação. Os sinais clínicos específicos de cada síndrome aparecem pouco depois.

Nos Bovinos, a espécie de *L. borgpetersenii* o sorotipo Hardjobovis e a *L. interrogans* sorotipo Hardjoprajitno estão adaptadas aos bovinos e associadas às duas condições: síndrome reprodutiva e a síndrome queda brusca do leite, respectivamente.

1) Síndrome reprodutiva: caracterizada por abortos, natimortos, terneiros fracos e infertilidade da vaca por mortalidade embrionária. Associada ao sorotipo Hardobovis.

2) Síndrome da queda brusca na produção leiteira: caracterizada pela flacidez de úbere com queda súbita da produção leiteira e com leite de coloração semelhante ao colostro; contagem celular alta, febre e anorexia. Associada ao sorotipo Hardjoprajitno.

Nos suínos, a infecção é subclínica ou assintomática. Abortamento tardio e, muitas vezes, o único sinal clínico da doença. Ocasionalmente, são observados sinais de metrites, icterícia, anemia e meningencefalites.

Nos equinos, a doença é caracterizada por febre, depressão, anorexia e icterícia. Oftalmia periódica ou abortos podem ocorrer após o pique febril.

PEQUENOS RUMINANTES

Nos ovinos, a infecção assintomática é mais frequente. Nos casos agudos, geralmente raros, os animais apresentam anorexia, abatimento, hemoglobinúria, icterícia, anemia e mortalidade alta (cordeiros). Na forma crônica, o quadro de nefrite é observado, mas os sinais clínicos são alterações reprodutivas, incluindo mortalidade e, sobretudo abortamentos. Os principais sorovares associados com a infecção / doença são: Grippytyphosa, Sejroe, Icterohaemorrhagiae e Tarassovi.

Nas cabras, a infecção conduz a icterícia, hemoglobinúria, infertilidade, abortamentos e a uma taxa de mortalidade alta nos animais jovens. Os sorovares mais frequentes são: Grippytyphosa, Pomona, Icterohaemorrhagiae e Canicola.

HOMEM

Um dos achados importantes na leptospirose é sua transmissibilidade ao homem. A leptospirose é uma doença ocupacional acometendo magarefes, fazendeiros ou veterinários. O homem pode ser infectado, durante as enchentes, especialmente os trabalhadores do departamento de limpeza pública. A incidência de reagentes à prova de aglutinação de pessoas com grande contato com animais infectados é surpreendentemente baixa e os casos clínicos no homem, bem rara.

A infecção humana pode ser adquirida, através do trabalho, exposições de lazer ou avocacional. A ocupação é um importante fator de risco para o homem. O contato direto com animais infectados representa a maioria das infecções em agricultores, veterinários, trabalhadores de matadouros, inspetores de carne, trabalhadores no controle de roedores e outras ocupações que requerem contato com animais. O contato indireto é importante para os trabalhadores da limpeza pública (esgotos), mineiros, soldados, limpadores de fossa séptica, os piscicultores, trabalhadores em canais, orizicultores, produtores de banana e cortadores de cana-de-açúcar.

A infecção humana ocorre, principalmente pela água contaminada, urina ou conteúdo uterino. Veterinários podem ser infectados pelo manuseio de vísceras ou urina de porcas que abortaram pela *L. interrogans* sorotipo Pomona. Apesar da presença de leptospiros no leite por poucos dias, durante o período febril, no quadro agudo da doença, sua permanência é curta, não resistindo à pasteurização.

CARNÍVOROS

Os principais sorovares associados às infecções de carnívoros são: Canicola e Icterohaemorrhagiae e, em menor frequência, Pomona, Grippotyphosa, Copenhageni, Bratislava, Ballum, Australis, Autumnalis, Hardjo e Bataviae. Nos caninos, as formas clássicas são devido aos sorovares Canicola e Icterohaemorrhagiae. Os cães representam uma fonte comum de infecção para o homem. Em um estudo sobre uma população de cães assintomáticos 6,9% das amostras cultivadas de urina foi positiva e todos os isolados foram

geneticamente caracterizados como sorovar Canicola pelo teste de sequenciamento de multilocus (MLST).

Há quatro síndromes identificadas na leptospirose canina: icterícia, hemorrágica, urêmica (doença de Stuttgart) e reprodutiva (aborto e filhotes prematuros ou fracos).

A leptospirose típica em cães inclui febre, icterícia, vômito, diarreia, coagulação intravascular disseminada, uremia causada por insuficiência renal, hemorragias e mortes. Os problemas respiratórios estão associados à hemorragia pulmonar observados na necropsia.

Doença de Stuttgart é a apresentação urêmica da leptospirose canina, incluindo vômito, polidipsia, oligúria e halitose devido à presença de úlceras na boca.

Abortos ou nascimento de filhotes fracos que geralmente morrem são menos comuns, mas não raro, durante sua primeira semana.

A infecção pelo sorovar *Icterohaemorrhagiae* se caracteriza por uma síndrome hemorrágica aguda ou subaguda, por apresentar hepatite severa e por uma síndrome urêmica. Os animais apresentam abatimento, icterícia, gastroenterite hemorrágica, febre e mialgias. O exame de sangue revela uma leucocitose, uma trombocitopenia e uma elevação nas enzimas hepáticas da bilirrubina da uréia e creatinina.

A infecção do sorovar *Canicola* é a origem da nefrite intersticial crônica e aproximadamente 15% dos casos apresentam hepatite. Essas formas clássicas são atualmente menos freqüentes, pois esses dois sorovares estão incluídos nas bacterinas.

As infecções devido a outros sorovares conduzem a apresentação renal (lesão dos túbulos renais com glicosúria) e, algumas vezes, icterícia (notadamente com o sorovar Bratislava). O sorovar Bratislava pode ser responsável por abortamentos e infertilidade.

Na década de 1980, foram registrados casos de gastroenterite aguda, geralmente fatal em filhotes de 3 a 6 meses. Eles foram causados por leptospirosas, mas à época confundidos com parvovirose.

Nos gatos, a leptospirose é menos freqüente ou não diagnosticada. Os sorovares identificados são: *Icterohaemorrhagiae*, *Pomona*, *Grippotyphosa*, *Ballum* e *Canicola*. Os sinais clínicos são comparáveis aos observados nos cães.

EQUINOS

A infecção nos equinos é geralmente assintomática e os anticorpos são frequentemente detectados nos animais hígidos. Os principais sorovares são: Pomona, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa, Autumnalis, Canicola, Sejroe e Bratislava (o cavalo seria um reservatório deste sorovar). A leptospirose crônica é normalmente detectada em equinos com uveíte recorrente, mas não é exclusiva desta espécie, ocorrendo ocasionalmente no homem. Equinos naturalmente ou experimentalmente infectados com *L. interrogans* desenvolveram uveíte clínica ou ERU ("*equine recurrent uveitis*") após 1-2 anos da infecção. Um estudo revelou que aproximadamente 52,8 % das amostras de humor vítreo com ERU foram positivas para o cultivo de *Leptospira* e 71% foram positivas pela PCR. Equinos com ERU também aumentaram os títulos de anticorpos para *Leptospira* em seu humor vítreo comparados aos do soro, sugerindo uma infecção ocular persistente com *Leptospira*. Reações cruzadas entre antígenos da córnea, do cristalino e leptospirose foram detectadas pelo *Western blot*. Mecanismos imunológicos locais contribuem na patogênese da ERU.

Quando a infecção é clinicamente expressa, ela se traduz por abortamentos, lesão renal, lesão hepática e lesão generalizada em potros. Algumas vezes, a forma clínica mais importante é uma uveíte que experimentalmente aparece após 12 a 24 meses da inoculação de leptospirose. Esta uveíte denominada de "uveíte isolada do cavalo" não apresenta características particulares, mas se ela persiste ou recidiva, ela é a origem de problemas de visão e de lesões do globo ocular (atrofia da íris, opacidade da córnea e opacidade do cristalino). Depois de 1988, uma forma recorrente desta uveíte era conhecida como "fluxão periódica" dos olhos que os ingleses denominam hoje de "*equine periodic ophthalmia*". Nos cavalos acometidos de uveíte, as leptospirose são isoladas do humor aquoso, mas a patogenia dessa infecção resulta da reação imune pela presença de antígenos da *Leptospira interrogans sensu lato* e de tecidos oculares (cristalino e a córnea). Nas leptospirose essa proteína localiza-se no interior da célula, possuindo peso molecular de 52 kDa. A uveíte do cavalo independente de sua origem é um defeito inaceitável.

SUÍNOS

Nos suínos, os sorovares principais incluem: Pomona, Kennewicki (Estados Unidos), Tarassovi, Bratislava, Muenchen, Icterohaemorrhagiae e, em menor grau, o sorovar Sejroe e Hardjo (em criações a campo) parece menos frequentes. O sorovar Pomona e Bratislava estão mais adaptados aos suínos. A sorologia demonstrou o papel do sorogrupo Icterohaemorrhagiae seguido do Australis, Tarassovi, Hebdomadis/Sejroe, Autumnalis, Pomona, Ballum e Grippytyphosa. O desenvolvimento de criações a campo aumentou o número de reagentes positivos observados depois de 1994.

Em 1994, foi identificado um novo sorovar, o sorovar Hurstbridge. Este sorovar é o único representante do sorogrupo Hurstbridge e, em 1998, ficou demonstrado que o sorovar Hurstbridge constituía uma nova espécie a qual foi denominada de *Leptospira fainei*. Este sorovar foi identificado na Austrália, mas os anticorpos foram demonstrados em suínos, na França, Nova Caledônia e no Vietnã; nos bovinos foi demonstrado na Austrália, na França e Indonésia; no homem foi detectado na Austrália, na Nova Caledônia e Vietnã.

Nos suínos, as leptospiroses se expressam sobre diversas formas, incluindo formas inaparentes; formas subclínicas (nefrite intersticial crônica que conduz a um quadro de insuficiência renal); formas moderadas (febre, anorexia, baixo desenvolvimento); formas severas (febre, icterícia, hemorragias e mortes). Os sinais clínicos mais comuns são consistentes com as alterações reprodutivas (infertilidade, abortamentos tardios, contaminação dos leitões por via transplacentária). Leptospirose provoca perdas econômicas significativas na suinocultura, especialmente na produção de carne, mas também tem sido uma importante fonte de transmissão para o homem.

Nos suínos, a leptospirose causa aborto, natimortos, leitões fracos, mumificação fetal e mortes, logo após o nascimento. A doença, nos leitões recém-nascidos, inclui hemorragias subcutâneas, hematuria, icterícia e morte. Os animais de engorda podem apresentar fraqueza, letargia e icterícia.

Anticorpos para leptospiroses dos sorovares Bratislava, Canicola, Pomona, Icterohaemorrhagiae e Tarassovi tem sido detectados em todo o mundo. O sorovar Pomona está associado aos abortos, mortes fetais, parto prematuro e nascimento de leitões fracos

que se desenvolvem pouco ou não sobrevivem. Os sorovares Bratislava e Icterohaemorrhagiae estão ligados aos natimortos.

MECANISMO DE RESISTÊNCIA E CONVALESCÊNCIA

A cura da leptospirose aguda coincide com suspensão da bacteremia e aparecimento de anticorpos circulantes, geralmente na segunda semana pós-infecção. Os anticorpos protetores são do tipo IgM e IgG, que são dirigidos, principalmente para os antígenos da estrutura externa. Os anticorpos aglutinantes, principalmente IgM podem ser detectados por muito tempo (anos) após a cura, não sendo indicativo do estado imune nem do estado de portador. O portador renal pode existir, na ausência de anticorpos ou pode desaparecer antes do desaparecimento dos anticorpos.

A imunidade que se instaura depois da cura é sólida e específica para o sorotipo. Entretanto pode ocorrer abortamento repetido em vacas com infecção para *L. hardjo*.

DIAGNÓSTICO

a) Métodos diretos

O exame direto pode demonstrar leptospiros no sangue, na urina, no líquido cefalorraquidiano (LCR) e nos tecidos. As leptospiros podem ser visualizadas por meio da microscopia de campo escuro ou contraste de fase; através das técnicas de coloração como as do Giemsa, Vermelho Congo ou impregnação pela prata (Levaditi ou Warthin-Starry). Essas técnicas são pouco sensíveis e pouco específicas, visto que as leptospiros são passíveis de serem confundidas com fibrina e com outras estruturas celulares.

O isolamento pode ser realizado inoculando os materiais (amostras), em diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6}) em meios apropriados para o cultivo, tais como Fletcher, Stuart, Noguchi, Korthof, Ellinghausen-McCullough, modificados por Johnson e Harris (EMJH), Tween-albumina. O isolamento pode ser realizado pela inoculação intraperitonial em animais de laboratório como: hamster ou cobaia.

Técnicas recentes na pesquisa de leptospiros em fluidos têm sido aperfeiçoadas, através do teste de ELISA de captura ou pela imunistoquímica (IHQ). Os resultados

obtidos com estas técnicas ampliam a capacidade de detecção das leptospiras íntegras ou fragmentadas. O agente é detectado com o auxílio de anticorpos específicos marcados com enzimas como peroxidase ou com fluoresceína.

A técnica de reação em cadeias pela polimerase (PCR) poderá melhorar a capacidade de resolução das técnicas consideradas diretas. Trabalhos com bovinos evidenciaram que esta técnica é capaz de detectar de 5 a 10 leptospiras / mL de urina. Entretanto, ela utiliza alta tecnologia e de grandes investimentos.

b) Métodos indiretos

A pesquisa de anticorpos específicos pode ser realizada, tanto no soro quanto no líquido cefalorraquidiano (LCR), através do teste de aglutinação microscópica (TAM) conhecida com a denominação inglesa de “MAT”. A demonstração de aglutininas é a técnica mais empregada no diagnóstico da infecção, a qual está baseada na reação de soraglutinação microscópica frente a uma coleção de antígenos vivos. É um teste trabalhoso que ainda é considerado teste referência para o diagnóstico da enfermidade.

O ponto de corte (“*cut off*”) é a diluição de 1/100 e, os soros que apresentarem reação igual ou superior a este título devem ser reavaliados frente ao sorotipo reagente em diluições seriadas de razão 2, a fim de seja obtido um título de aglutininas. É importante e desejável que se proceda a uma análise comparativa (amostras pareadas) de 2 amostras de soro colhidas a intervalo de 10 - 21 dias para que se possa caracterizar a conversão sorológica.

A técnica de ELISA é uma técnica de valor, na detecção de imunoglobulinas específicas da classe IgM, IgG e IgA, possibilitando a distinção da infecção recente, da ocorrida no passado, com uma única amostra de soro. Essa técnica é mais sensível e específica que a reação de soraglutinação. Há pesquisa de IgM no LCR pela técnica de ELISA e o emprego da saliva para o diagnóstico rápido da leptospirose, detectando anticorpos específicos da classe IgM pela técnica do ELISA.

Manutenção de culturas:

As leptospiros são sensíveis ao peróxido de hidrogênio, entretanto soro hemolisado de coelho deve ser incorporado ao meio de cultura. As culturas estoque devem ser mantidas em EMJH e Fletcher semissólido. Os antígenos são multiplicados em meio de Stuart, Kortoff ou EMJH líquido.

As dificuldades do diagnóstico bacteriológico clássico e do diagnóstico sorológico permitiram o desenvolvimento do diagnóstico molecular, através do PCR. A ampliação de uma sequência de 331 pb do gene *rrs*, específico do gênero *Leptospira*, permitiu a hibridização por uma sonda complementar desenvolvida pelo Instituto Pasteur de Paris. Ela permitiu o diagnóstico rápido (36 horas), podendo ser positivo a partir do primeiro dia de evolução da doença em amostras clínicas de sangue e urina. Sua positividade em amostras do humor aquoso permite realizar o diagnóstico das complicações oculares. Outras técnicas de amplificação foram propostas, especialmente a técnica de amplificação de uma sequência do gene *rrs*, mas utilizando dois conjuntos de primers diferentes: um conjunto específico para cepas patogênicas e um conjunto específico para cepas saprófitas. Esta técnica permitiu detecção de cepas patogênicas no meio externo; detectou amostra patogênica em amostras clínicas; evidenciou que a *L. meyeri* congrega sorovares saprófitas e sorovares patogênicos e que a *L. fainei* pertence a um grupo de leptospira patogênicas.

TRATAMENTO PREVENTIVO

- a) Afastamento das causas (restos de alimento e água).
- b) Controle de roedores.
- c) Eliminação dos portadores.

TRATAMENTO MEDICAMENTOSO

O tratamento consiste na aplicação parenteral de estreptomicina (25-30 mg / Kg) uma a duas vezes. Pode-se associar penicilina à estreptomicina, provocando um sinergismo de ação antimicrobiana na eliminação do portador. O tratamento com antimicrobiano pode

diminuir a resposta imune para a doença e torná-lo suscetível ao mesmo sorovar ou sorotipo.

CONTROLE E PREVENÇÃO

A imunização constitui um meio importante no controle da leptospirose, mas ela não é por si só, suficiente na prevenção da infecção/doença.

As bacterinas encontradas no mercado possuem geralmente os seguintes sorovares:

- 1) Sorovar Icterohaemorrhagiae, 2) Sorovar Canicola, 3) Sorovar Grippotyphosa,
- 4) Sorovar Hardjo, 5) Sorovar Pomona 6) Sorovar Autumnalis.

Existe também o sorovar Bratislava, especialmente em suínos, bovinos e equinos e o sorotipo Bratislava mais cinco sorotipos.

Nos caninos há bacterinas bivalentes, contendo os sorovares Canicola e Icterohaemorrhagiae estão no mercado, desde os anos 50. Os primeiros estudos realizados por Broom mostraram que os hamsters podiam ser protegidos com cultivos (sorovar Canicola) tratados pelo fenol.

Brunner e Meyer (1950) imunizaram caninos e hamsters com uma bacterina, contendo os sorovares Canicola e Icterohaemorrhagiae. Mostraram que somente proteção para os sorovares específicos. As bacterinas geralmente protegem contra a doença e o estado de portador renal sob as condições experimentais, mas a transmissão do sorovar Icterohaemorrhagiae de cães imunizados para o homem já foi relatado. Além disso, os cães vacinados podem estar infectados com sorotipos diferentes daqueles contidos em vacinas comerciais (Prescott, 2008). Bacterinas podem incluir sorovares Grippotyphosa e Pomona além dos sorovares tradicionais, em resposta ao aumento da incidência da infecção canina com estes sorovares. Alguns desses imunógenos são bacterinas de subunidades, contendo membrana externa a qual mostrou proteção em ensaios com hamsters desafiados com um sorovar Canicola.

Leptospiroses Bovina

INTRODUÇÃO

A leptospirose nos bovinos, assim como na maioria dos animais domésticos, é uma zoonose bacteriana associada, principalmente com infertilidade e baixa produção.

Os prejuízos econômicos e reprodutivos são associados aos abortos, natimortos e queda na produção de leite.

A doença possui diagnóstico complexo e difícil pela perda de sinais clínicos característicos; pela dificuldade de diagnóstico; pela relação complexa entre agente-hospedeiro e pelas mudanças no padrão de infecção.

A leptospirose é uma infecção/doença causada por espiroqueta do gênero *Leptospira* spp. As leptospiras patogênicas eram classificadas como membro da espécie *Leptospira interrogans*. O gênero foi recentemente reorganizado e as leptospiras patogênicas são agora, identificadas e distribuídas em 12 diferentes espécies. Há mais de 200 sorovares de leptospiras patogênicas identificadas em todo o mundo. Sorovares são identificados, tendo como base, os antígenos de superfície do microrganismo.

DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

A maioria dos sorovares possui uma determinada distribuição geográfica. Diferentes sorovares de leptospiras são mais prevalentes em determinadas regiões, estando associados com um ou mais hospedeiros (natural ou de manutenção), os quais servem como reservatórios da infecção. O hospedeiro natural, geralmente é uma espécie silvestre e, algumas vezes, animais domésticos.

TRANSMISSÃO

A transmissão da infecção entre os hospedeiros de manutenção, geralmente é eficiente e a incidência da infecção é relativamente alta. Hospedeiros acidentais não são importantes reservatórios da infecção e a incidência de transmissão é baixa. A transmissão da infecção de um hospedeiro acidental para outro é, relativamente rara. A transmissão

entre os hospedeiros de manutenção é direta, envolvendo o contato com urina infectada, fluidos placentários ou leite. Além disso, a infecção pode ser transmitida por via venérea ou via transplacentária. A infecção de hospedeiros acidentais é geralmente indireta, pelo contato com urina dos hospedeiros de manutenção, em áreas infectadas.

AMBIENTE

As condições ambientais são críticas na frequência da transmissão indireta. A sobrevivência das leptospirosas é favorecida pela umidade, pela temperatura moderadamente quente (28°C), pela água estagnada neutra. Sua sobrevivência pequena e breve em solos secos ou a temperatura inferior a 10°C ou superior a 34°C.

DISTRIBUIÇÃO

A leptospirose bovina possui distribuição mundial, ocorrendo no outono-inverno nos climas temperados e na estação das chuvas nos países tropicais.

DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

A prevalência (anticorpos aglutinantes com título superior a 100) entre bovinos, nos Estados Unidos, está estimada em 29% para o sorovar Hardjo; 23% para o sorovar Pomona; 19% para o sorovar Icterohaemorrhagiae e 11% para o sorovar Canicola.

Recentemente, a infecção com o sorovar Hardjo tornou-se crescente, coincidindo com o declínio, em importância, das infecções pelo sorovar Pomona.

ETIOPATOGENIA

As leptospirosas invadem, após ser depositada nas membranas mucosas ou pele lesionada. Após um período variado de incubação (3-20 dias), as leptospirosas circulam pela corrente sanguínea. Durante este período, multiplica-se no fígado, baço, rins, trato reprodutor, olhos e SNC. Anticorpos aglutinantes podem ser detectados, concomitantemente com as leptospirosas presentes na corrente sanguínea. O aparecimento de anticorpos circulantes coincide com a eliminação de leptospirosas dos órgãos. As leptospirosas

podem permanecer nos rins e trato urinário ou podem ser eliminadas por semanas a meses, após a infecção. Nos hospedeiros de manutenção, as leptospirosas podem persistir no trato genital, no líquido cefalorraquidiano e no humor vítreo.

SINAIS CLÍNICOS

Os sinais clínicos associados à leptospirose variam, dependendo do sorovar e do hospedeiro. Os sorovares de maior importância são Hardjo e Pomona, especialmente na América do Norte, América do Sul, Austrália e Nova Zelândia, enquanto que Hardjo na Europa. A doença causada por outros sorovares é menos frequente.

Nos hospedeiros de manutenção, a leptospirose é caracterizada por baixa resposta sorológica, discretos sinais clínicos, discretos sinais na doença aguda e prolongado estado de portador renal que pode ser associado, com doença renal crônica.

Nos hospedeiros acidentais, a leptospirose é causa de severa doença, estando associada a altos títulos de anticorpos aglutinantes e um curto estado de portador renal.

Os sinais clínicos variam com a susceptibilidade do hospedeiro e com o sorovar infectante.

Animais jovens são, de uma maneira geral, mais seriamente afetados do que adultos. Muitas infecções são subclínicas, particularmente em fêmeas vazias ou lactantes, sendo somente detectada pela presença de anticorpos ou lesões de nefrite intersticial, em matadouro. A leptospirose aguda ou subaguda está mais associada com infecções nos hospedeiros acidentais. Os sinais clínicos associados às infecções crônicas (sorovar Hardjo) são caracterizados por abortamentos e natimortos. A doença severa pode ocorrer em terneiros (bezerros) infectados com sorovares acidentais, particularmente o sorovar Pomona. Os sinais clínicos incluem: febre alta, anemia hemolítica, hemoglobinúria, icterícia, congestão pulmonar; ocasionalmente meningite e morte. Nas vacas lactantes, as infecções acidentais estão geralmente associadas à agalaxia (leite tingido de sangue) e recuperação prolongada.

A forma aguda em vacas leiteiras inclui febre transitória, queda brusca na produção leiteira, a qual pode perdurar de 2 a 10 dias. Isto é chamado "*milk drop syndrome*". O leite

apresenta consistência de colostro com coágulos espessos de coloração amarelada e contagem alta de células somáticas. O úbere apresenta textura uniformemente macia. Esta forma de infecção ocorre comumente na infecção do sorovar Hadjoprajitno, mas também por outros sorovares. A forma de "*milk drop syndrome*" varia de uma infecção epizootica em um rebanho não exposto (envolvendo mais da metade do rebanho durante um período de 1 - 2 meses) até a infecção endêmica, afetando vacas em sua 1ª - 2ª lactação com recuperação, geralmente em torno de 10 dias, mesmo sem qualquer tipo de terapia. A forma subclínica da "*milk drop syndrome*" pode ocorrer em vacas lactantes, infectadas com sorovar Hardjo na ausência de outras evidências clínicas de infecção.

A forma crônica da infecção pelo sorovar Hardjobovis e Pomona está relacionada à infecção fetal, em animais prenhes, que apresentam: abortos, natimortos e nascimento de prematuros, animais infectados e fracos. Animais infectados, mas aparentemente saudáveis podem nascer. A retenção de membranas fetais pode estar associada com aborto pelo sorovar Hardjobovis. Abortos e natimortos são as únicas manifestações da infecção, mas algumas vezes, pode estar relacionada com episódio da doença, há mais de 6 semanas (sorovar Pomona) ou 12 semanas (sorovar Hardjobovis). O sorovar Hardjo tipo hardjoprajitno parece ser mais virulento que o Hardjo tipo hardjobovis.

O aborto causado pelo sorovar Pomona tem diminuído de importância, nestas últimas décadas, provavelmente pela vacinação. Abortos e natimortos devidos ao sorovar Hardjo são mais comuns, sendo hoje, mais importante que o sorovar Pomona por causar tanto doença endêmica, quanto doença esporádica. Num estudo realizado na Irlanda do Norte, onde ocorre o sorovar mais virulento (Hadjoprajitno) foi responsável por metade dos abortos em bovinos. O tipo Hadjoprajitno foi isolado da maioria dos fetos abortados enquanto que o tipo Hardjobovis foi isolado, principalmente dos rins e trato genital de vacas portadoras.

No Canadá, onde o tipo Hardjobovis é prevalente; o sorovar Hardjobovis causou cerca de 6% dos abortos e abortos causados pelo sorovar Pomona não foram reconhecidos.

Na Austrália e Nova Zelândia, a infecção pelo sorovar Hardjobovis não é comumente identificada como causa de falha reprodutiva em bovinos. A infecção é comum em bovinos

e a incidência de infecções humanas associadas com bovinos infectados é relativamente alta. A infertilidade não tem sido bem documentada concentrando-se na localização de leptospiros no útero e oviduto de bovinos infectados pelo sorovar Hardjo.

DIAGNÓSTICO CLÍNICO

O diagnóstico da leptospirose é dependente de uma boa história clínica, da vacinação, da disponibilidade de testes laboratoriais e de pessoal com experiência no diagnóstico da leptospirose.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

A coordenação entre o diagnóstico laboratorial e o veterinário é necessária para maximizar a chance de fazer um diagnóstico seguro. É aconselhável contactar o laboratório de diagnóstico, antes do envio de amostras, assegurando que as mesmas sejam colhidas e que cheguem ao laboratório, em condições satisfatórias. Além disso, em situações problema pode ser necessário consultar laboratórios de referência ou laboratórios regionais que possuam especialistas no diagnóstico desta infecção.

Os testes utilizados no diagnóstico da leptospirose podem ser classificados naqueles aplicados na detecção de anticorpos contra o organismo ou que visam detectar o organismo ou seu ADN, em tecidos e fluidos. Cada um dos procedimentos diagnósticos possui um número de vantagens e desvantagens. Alguns dos ensaios sofrem com a perda de sensibilidade e outros, propensos a problemas com a especificidade. Por esta razão, não há uma única técnica recomendada para uso em todas as situações. O uso de testes combinados permite uma maior sensibilidade e especificidade no diagnóstico. O teste sorológico é recomendado em cada caso combinado com uma ou mais técnicas na identificação do organismo em tecidos ou fluidos corpóreos.

DETECÇÃO DE LEPTOSPIRAS

Direto ou Microscopia de campo escuro:

A microscopia de campo escuro tem sido utilizada como teste de triagem rápida na identificação de leptospiros na urina. A vantagem da microscopia de campo escuro é a velocidade e a desvantagem inclui baixa especificidade e sensibilidade. A visualização direta do organismo é problemática, pois artefatos presentes em fluidos corporais são difíceis de identificação mesmo para pessoas experientes. A sensibilidade da microscopia de campo escuro é baixa; aproximadamente 10^5 leptospiros / mL de urina devem estar presentes para serem detectadas. É importante entender que as leptospiros estão presentes na urina em graus variáveis e, nem sempre presentes, na fase inicial da doença aguda. A microscopia de campo escuro, em mãos experientes, pode se útil no diagnóstico preliminar da leptospirose, mas não devemos nos basear como diagnóstico definitivo ou para eliminar a leptospirose de diferentes diagnósticos.

Imunofluorescência:

A imunofluorescência pode ser utilizada na visualização de leptospiros nos tecidos, sangue ou sedimento urinário. A utilidade desse teste está aumentando; ele é rápido; tem boa sensibilidade e pode ser aplicado em amostras congeladas. A interpretação pode ser difícil e requer um técnico qualificado. O conjugado fluorescente, para uso geral, não é sorovar específico; exame sorológico do animal é necessário para identificar o sorovar infectante. O conjugado sorovar específico foi desenvolvido, estando em uso no Canadá e Reino Unido e alguns laboratórios de pesquisa.

Cultivo ou exame bacteriológico:

O isolamento do sangue, da urina ou tecido é o método definitivo para o diagnóstico da leptospirose. A leptospiremia ocorre no início do curso clínico (curta duração e pequeno número). O sangue é útil para cultivo, nos primeiros dias de doença clínica e antes da terapia antimicrobiana. As leptospiros estão presentes na urina, em aproximadamente, 10 dias, após o começo dos sinais clínicos. A urina para cultivo deve ser coletada após

aplicação de furosemida. A furosemida aumenta a taxa de filtração glomerular, drena mais leptospiras na urina e dilui a urina, aumentando a sobrevivência dos microrganismos. Amostras de urina, sangue e tecidos para isolamento devem ser rapidamente diluídas em meio de transporte, contendo 1% de albumina sérica bovina. O cultivo de leptospiras é difícil, demorada e requer meio de cultivo especializado, mas o isolamento permite a identificação definitiva do sorovar infectante. Os laboratórios de diagnóstico, raramente cultivam as amostras. Poucos laboratórios particulares podem conduzir tais testes.

Histopatologia:

O uso de corantes especiais pode ser eficaz na identificação de leptospiras em tecidos animais. Esta técnica comum de diagnóstico é a única que pode ser utilizada em tecidos fixados pelo formol. Tecidos, incluindo os rins, no adulto e placenta, pulmões, fígado e rins em casos de aborto podem utilizar esta técnica diagnóstica. As leptospiras não são visíveis nos tecidos processados pelos corantes rotineiros, mas a inflamação característica pode ser observada nos rins afetados, entretanto as lesões hepáticas são discretas e menos específicas.

A aplicação de corantes à base de prata ou corantes imunoistoquímicos, em cortes de tecidos, permite a detecção de leptospiras ou antígenos destes, nos túbulos renais; no interstício do rim, fígado, pulmão ou placenta. Baixa sensibilidade é a desvantagem desta técnica diagnóstica. Leptospiras estão frequentemente presentes em pequeno número nos tecidos afetados, particularmente na leptospirose crônica. O sorovar infectante não pode ser determinado pela histopatologia e estudos sorológicos devem ser conduzidos.

Testes Moleculares ou Detecção de DNA:

Técnicas mais recentes permitem a detecção do ADN das leptospiras em amostras clínicas. Estes testes incluem teste de sonda de ADN que detectam ADN de leptospiras diretamente, sendo baseados na ampliação do ADN, pelo PCR em tecidos e fluidos corporais. Geralmente a sonda de ADN não é utilizada pela perda de sensibilidade e pelas dificuldades técnicas no seu uso. O teste tem sido utilizado para o diagnóstico da

leptospirose em animais. Diferentes protocolos de PCR estão disponíveis e cada laboratório escolhe o seu melhor. Em geral, o PCR da urina é mais útil do que dos tecidos. O processamento de amostras (tecidos) é mais difícil, pois frequentemente, contem inibidores que podem causar resultados falsos positivos.

A maioria dos ensaios de PCR é capaz de detectar a presença de leptos, mas não são capazes de detectar o sorovar infectante. O PCR pode ser uma técnica sensível e específica para o diagnóstico da leptospirose. Infelizmente, o processo é complexo e extremamente sensível à contaminação com ADN exógeno (*leptospira*), podendo causar reações falso-positivas. É muito importante que os resultados de PCR possam ser interpretados com total conhecimento da qualidade dos procedimentos e controles utilizados no laboratório.

TESTES SOROLÓGICOS

Testes sorológicos são utilizados no diagnóstico da leptospirose nos animais. O teste de aglutinação microscópica e os vários testes de ELISA são os testes mais utilizados. A sorologia é barata, razoavelmente sensível e amplamente aplicada.

O teste de aglutinação microscópica é utilizado em todo o mundo, envolvendo a mistura, em diluições apropriadas, de soro e leptos vivas (sorovares + prevalentes nesta região). A presença de anticorpos é indicada pela aglutinação de leptospiras.

O teste imunoenzimático (ELISA) foi desenvolvido, utilizando um número de diferentes preparações antigênicas e protocolos de ensaios. O ensaio que estima a quantidade de IgM antileptospira é útil na detecção da infecção recente. O uso deste ensaio é complicado, em áreas do mundo em que a vacinação é comum, pois alguns animais vacinados desenvolvem títulos tanto para IgM quanto para IgG, produzindo resultados positivos e confusos ao teste.

A detecção de altos títulos de anticorpos em animais suspeitos pode ser suficiente no estabelecimento do diagnóstico. Isto é verdadeiro na investigação de abortos causados por infecções de hospedeiros acidentais, na qual o título de anticorpos, na mãe é superior ou igual a 1:1.600. Entretanto, nos hospedeiros de manutenção, particularmente o sorovar Hardjo em bovinos, os animais infectados mostram uma resposta aglutinante pequena para

a infecção. Frequentemente, na época do aborto os títulos de anticorpos podem estar bem baixos ou negativos nos hospedeiros de manutenção. Nestes casos, a resposta sorológica do rebanho à infecção é mais importante do que a resposta individual no estabelecimento do diagnóstico. O teste no soro fetal é mais útil no aborto e natimorto, embora as diluições devam partir de 1:10; em contraste, com os testes realizados nos adultos em a diluição de partida é 1:100.

DIFICULDADES

A interpretação dos resultados de testes sorológicos é complicada por inúmeros fatores. Estes fatores incluem: reações cruzadas, títulos de anticorpos induzidos por vacinação, perda de consenso entre o título de anticorpos e os indicativos de infecção ativa.

Os anticorpos produzidos no animal, em resposta à infecção com um dado sorovar de *Leptospira*, freqüentemente reage (reação cruzada) com outro sorovar de *Leptospira*. Entretanto, uma vaca infectada com um único sorovar, provavelmente tenha anticorpos para mais que um sorovar no teste de aglutinação. Em alguns casos, esse padrão de reação cruzada é previsível, tendo como base, o seu parentesco entre os vários sorovares do gênero *Leptospira*. Infelizmente, padrões de reações cruzadas variam bastante, entre as espécies animais e entre indivíduos, dentro de uma mesma espécie. Geralmente o sorovar infectante é assumido como o sorovar para o qual aquele animal desenvolve o maior título.

As reações paradoxais podem ocorrer com o teste de aglutinação, no início do curso da infecção aguda, com uma acentuada resposta de anticorpos aglutinantes para um sorovar outro que não o infectante.

A difusão da imunização de bovinos com vacinas em muitas partes do mundo complicaram a interpretação da sorologia. Em geral, os bovinos desenvolvem baixos níveis de anticorpos aglutinantes (100 a 400) em resposta à vacinação e, estes títulos permanecem por um a três meses, após a vacinação. Entretanto, alguns animais desenvolvem altos títulos após a vacinação e embora esses altos títulos diminuam com o tempo, eles podem persistir por seis meses ou mais, após a vacinação.

O terceiro fator complicador na interpretação dos testes sorológicos é causado pela perda de consenso do que é "significativo" para o diagnóstico da infecção. Um título aglutinante superior ou igual a 100 é considerado significativo por muitos. O ponto de corte ou "cut-off" pode ser excessivo em animais vacinados e pode não ser alcançado, na infecção de hospedeiro de manutenção. O diagnóstico da leptospirose baseado numa única amostra deve ser realizado com cautela e com total consideração do quadro clínico e histórico de vacinação.

Na leptospirose aguda, o aumento de título na ordem de quatro vezes superior é freqüentemente observado em amostras pareadas. Entretanto os hospedeiros de manutenção estão eliminando leptospirose com títulos $\leq 1:100$. Por isso, um título baixo de anticorpos não necessariamente, determina o diagnóstico de leptospirose. Títulos de anticorpos podem persistir por meses, após a infecção ou recuperação, mas há um declínio gradual nos títulos com o tempo.

TRATAMENTO

Animais com leptospirose aguda podem ser tratados com estreptomicina (12,5 mg / kg 2 X ao dia, durante 3 dias) ou tetraciclina (10-15 mg / kg 2 X ao dia, durante 3 - 5 dias).

O tratamento com estreptomicina pode ser combinado com ampicilina ou com grandes doses de penicilina G. As leptospirose podem ser suscetíveis à eritromicina, à tiamulina e à tilosina, embora esses ATMs não tenham como objetivos o tratamento de portadores renais. Uma única dose de estreptomicina (25 mg / kg) poderia remover o portador renal crônico causado pela *Leptospira Pomona* e outros sorovares. As infecções crônicas pela *Leptospira Hardjo* tipo Hardjo-prajitno podem resistir ao tratamento. Oxitetraciclina injetáveis de longa duração, na dose de 20 mg / kg ou amoxicilina, na dose de 15 mg / kg com 2 injeções (48 h de intervalo) pode substituir a estreptomicina no tratamento das infecções crônicas.

CONTROLE E PREVENÇÃO

O objetivo do controle na leptospirose é variável em diferentes partes do mundo. Em algumas áreas, a leptospirose é causa de morbidade e perdas dentro da população bovina e, programas de controle são instituídos para reduzir essas perdas com ênfase na prevenção da doença clínica. Em outras regiões, como na Nova Zelândia e Holanda, a doença nos animais causada pelo sorovar Hardjo é um problema menor comparado com a alta incidência da infecção humana. Nessas circunstâncias, os programas de controle são aplicados nos bovinos para controlar a leptospirose nos seres humanos com ênfase de prevenção de animais eliminadores pela urina.

O programa de controle/prevenção da leptospirose bovina poderia ter dois objetivos:

- a) A prevenção de portadores renais e b) Prevenção da doença clínica.

A leptospirose pode ser erradicada de um rebanho ou região, associando a identificação dos portadores e tratamento com ATMs, mas essa abordagem depende de controles firmes com respeito à introdução de novos animais, pois nem sempre é possível, dada às condições domésticas. A desvantagem da erradicação é que torna o rebanho suscetível à infecção por leptospiros introduzidas pelos hospedeiros naturais (animais domésticos ou silvestres).

O controle de uma maneira geral está baseado:

- 1-Prevenção da exposição; 2-Vacinação e 3-Tratamento seletivo.

Esforços devem ser efetuados para limitar o contato direto e indireto entre bovinos e portadores de infecções incidentais como o controle de vetores ao redor de galpões, cercas ao redor de pântanos e córregos. Além disso, adequados procedimentos de quarentena devem ser realizados para prevenir a introdução dos sorovares Hardjo e Pomona no rebanho, através da compra de animais infectados.

IMUNÓGENOS (BACTERINAS)

A imunidade é sorovar específica. Vacinas polivalentes estão disponíveis no mercado, contendo os sorovares mais endêmicos para este rebanho ou região. As vacinas utilizadas em determinada região do mundo são vendidas para outra, podendo não causar

proteção contra o sorovar local. Além disso, algumas bacterinas podem conter sorovares não associado com a enfermidade na região. Diferentes vacinas variam em eficácia e falhas vacinais podem ocorrer.

Nos rebanhos fechados está indicada a vacinação anual de todos os bovinos com bacterinas apropriadas, ou duas vacinações anuais em rebanhos abertos.

A vacinação pode ser combinada com o tratamento ATMs se houver risco de surto. Animais novos introduzidos no rebanho devem ser vacinados antes de sua entrada e tratados com dihidroestreptomicina (25 mg / kg; IM; duas doses com intervalo de 10 dias). Oxitetraciclina de longa ação (20 mg / kg; IM; duas doses com intervalo de 10 dias) ou amoxicilina (15 mg / kg; IM; 2 doses com intervalo de 48 horas) para eliminação da maioria dos portadores renais crônicos.

Os bezerros devem ser vacinados com idade acima de 4-6 meses e reforço, após 4 semanas e, só então, imunizados com uma dose anual única. A imunização deverá ser realizada com bacterina anualmente, pois a resposta aglutinante é de curta duração e de baixos títulos, podendo progressivamente reduzir e, eventualmente desaparecer. A vacinação de animal infectado não impedirá a eliminação de leptospiras pela urina, mas aumenta os títulos de anticorpos. A comercialização de reprodutores fica prejudicada e os animais impedidos de serem utilizados na inseminação ou exportados quando são reagentes (títulos baixos) e o tratamento, geralmente não altera esses títulos.

A baixa sensibilidade dos testes de aglutinação na detecção dos portadores do sorovar Hardjo e as recomendações do Código Internacional Zoossanitário (OIE) para a importação de animais domésticos sugerem o tratamento com antimicrobianos desses animais, antes de qualquer tipo de movimentação ou testes sorológicos. A regulamentação geral deve ser mudada, especialmente nas criações de touros e exportação de animais, permitindo o controle, através da combinação de vacinação com tratamento antimicrobiano e o uso de testes na detecção de portadores. A imunização, utilizando sorovares acidentais produz excelente proteção contra o desafio. Observações de campo têm mostrado que a vacinação com o sorovar Hardjo reduz as perdas reprodutivas assim como a leptospirúria. Um série de estudos experimentais e dados de campo nos Estados Unidos mostraram que a vacinação

Gênero *Leptospira* spp
FAVET - UFRGS
Prof. Marcos JP Gomes
2015

com vacinas disponíveis nos Estados Unidos não previnem a infecção renal e eliminação urinária ou infecção fetal com sorovar Hardjo-bovis. Entretanto um estudo semelhante conduzido com bacterina com sorovar Hardjo produzida na Austrália (CSL) mostrou boa proteção contra a infecção; contra a eliminação urinária seguida do desafio com cepa isolada do sorovar Hardjo, nos Estados Unidos. A razão para essas diferenças está na eficácia das vacinas contendo o sorovar Hardjo inclui: Composição vacinal, Condições domésticas, Patogenicidade da amostra prevalente na região.

Gênero *Leptospira* spp
FAVET - UFRGS
Prof. Marcos JP Gomes
2015

Referências Bibliográficas para o Gênero *Leptospira* spp

- Adler, B.; De La Peña Moctezuma, A. *Leptospira* In: Gyles, CL.; Prescott, JF.; Songer, G.; Thoen, CO. **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals** 4.Ed. Wiley-Blackwell cap 28 p. 527-547, 651p. 2010.
- Adler, B.; Faine, S. A pomona serogroup-specific, agglutinating antigen in *Leptospira*, identified by monoclonal antibodies. **Pathol.**, v. 15, n. 3, p. 247-250, 1983.
- Adler, B.; Murphy, AM.; Locarnini, SA.; Faine, S. Detection of specific anti-leptospiral immunoglobulins M and G in human serum by solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay. **J. Clin. Microbiol.**, v. 11, n.5, p. 452-457, 1980.
- Adler, BA.; Faine, S. 1983. Species- and genus-specific antigens in *Leptospira*, revealed by monoclonal antibodies and enzyme immunoassay. **Zentbl. Bakteriol.**, v. 255, p. 317–322, 1983.
- Ahmed, N.; Devi, SM.; Valverde, ML.; Vijayachari, P.; Machang'u, RS.; Ellis, WA et al. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. **Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.**, v. 5, p. 28, 2006.
- Alexander, AD.; Benenson, AS.; Byrne, RJ.; Diaz-Rivera, RS.; Evans, LB.; Gochenour, WS.; Hall, HE.; Hightower, JA.; Jeffries, H.; de Jesus, J.; Martinez, E.; Paniagua, M.; Pons, JA.; Ramos-Morales, F.; Rodriguez-Molina, R.; Swisher, KY.; Woodward, TE.; Yager, RH. Leptospirosis in Puerto Rico. **Zoonoses Res.**, v. 2, p. 152–227, 1963.
- Alexander, AD.; Lessel, EF.; Evans, LB.; Franck, E.; Green, SS. Preservation of leptospires by liquid-nitrogen refrigeration. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 22, p. 165–169, 1972.
- André-Fontaine, G. Canine leptospirosis do we have a problem? **Vet. Microbiol.**, v. 117, n. 1, p. 19-24, 2006.
- Asuthkar, S.; Velineni, S.; Stadlmann, J.; Altmann, F.; Sritharan, M. Expression and characterization of an iron-regulated hemin-binding protein, HbpA, from *Leptospira interrogans* serovar Lai. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 9, p. 4582-4591, 2007.
- Athanazio, DA.; Santos, CS.; Santos, AC.; McBride, FWC.; Reis, MG. Experimental infection in tumor necrosis factor alpha receptor, interferon gamma and interleukin 4

- deficient mice by pathogenic *Leptospira interrogans*. **Acta Trop.**, v. 105, n.1, p. 95-98, 2008.
- Ayanegui-Alcerreca, MA.; Wilson, PR.; Mackintosh, CG.; Collins-Emerson, JM.; Heuer, C.; Midwinter, AC.; Castillo-Alcala, F. Leptospirosis in farmed deer in New Zealand: A review. **NZ Vet. J.**, v. 55, n. 3, p.102-108, 2007.
- Babudieri, B.; Castelli, M.; Pisoni, F. Comparative tests with formalized and irradiated vaccines against leptospirosis. **Bull. WHO.**, v. 48, n. 5, p. 587-590, 1973.
- Ballard, SA.; M. Williamson, M.; Adler, B.; Vinh, T.; Faine, S. Interactions of virulent and avirulent leptospire with primary cultures of renal epithelial cells. **J. Med. Microbiol.**, v. 21, n. 1, p. 59-67, 1986.
- Barbosa, AS.; Abreu, PAE.; Vasconcellos, AS.; Morais, ZM.; Gonçalves, AP.; Silva, AS.; Daha, MR.; Isaac, L. Immune evasion of *Leptospira* spp. By acquisition of human complement regulator C4BP. **Infect. Immun.**, v. 77, n. 3, p. 1137-4113, 2008.
- Barcellos, C.; Lammerhirt, CB.; Almeida, MAB.; Santos, E. Distribuição espacial da leptospirose no Rio Grande do Sul, Brasil: recuperando a ecologia dos estudos ecológicos. **Cad. Saúde Pública-RJ**, v. 19, n. 5, p.1283-1292, 2003.
- Bernard, WV. Leptospirosis. **Vet. Clin. North America: Equine Pract.** v. 9, n. 2, p. 435-444, 1993.
- Bharti, AR.; Nally, JE.; Ricaldi, JN.; Matthias, MA.; Diaz, MM.; Lovett, MA.; Levett, MA. ; Gilman, RH.; Willig, MR.; Gotuzzo, E.; Vinetz, JM. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infect. Dis.**, v. 3, n. 12, p. 757-771, 2003.
- Bolin, C. Diagnosis of leptospirosis: a reemerging disease of companion animals. **Sem. Vet. Med. Surg. (Small Animals)**, v. 11, n. 3, p. 166-171, 1996.
- Bolin, C.; Zuerner, R.; Trueba, G. Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine containing *Leptospira interrogans* serovar Hardjo type harjo - bovis on type hardjo - bovis infection of cattle. **Am. J. Vet. Res.**, v. 50, n. 12, p. 2004-2008, 1989.
- Bourhy, P.; Louvel, H.; Saint Girons, I.; Picardeau, M. Random insertional mutagenesis of *Leptospira interrogans*, the agent of leptospirosis, using a *mariner* transposon. **J. Bacteriol.**, v. 187, n. 9, p. 3255-3258, 2005.

- Branger, C.; Chatrenet, B.; Gauvrit, A.; Aviat, F.; Aubert, A.; Bach, JM.; André-Fontaine, G. Protection against *Leptospira interrogans* Sensu Lato Challenge by DNA Immunization with the Gene Encoding Hemolysin-Associated Protein 1. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 7, p. 4062-4069, 2005.
- Branger, C.; Sonrier, C.; Chatrenet, B.; Klonjkowski, B.; Ruvoen-Clouet, N.; Aubert, A.; André-Fontaine, G. ; Eloit, M. Identification of the Hemolysis-Associated Protein 1 as a Cross-Protective Immunogen of *Leptospira interrogans* by Adenovirus-Mediated Vaccination. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 11, p. 6831-6838, 2001.
- Brenner, DJ.; Kaufmann, AF.; Sulzer, KR.; Steigerwalt, AG.; Rogers, FC.; Weyant, RS. 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.**, v. 49, p. 839–858, 1999.
- Brown, PD.; Gravekamp, C.; Carrington, DG.; Van de Kemp, H.; Hartskeerl, RA.; Edwards, CN.; Everard, COR.; Terpstra, WJ.; Levett, PN. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis . **J. Med. Microbiol.**, v. 43, n. 2, p. 110-114, 1995.
- Brown, R.; Blumberman, S.; Gay, C.; Bolin, C.; Duby, R.; Baldwin, C. Comparison of three different leptospiral vaccines for induction of a type 1 immune response to *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo. **Vaccine**, v. 21, p. 4448-4458, 2003.
- Brunner, KT.; Meyer, KF. Immunization of hamsters and dogs against experimental leptospirosis. **J. Immunol.**, v. 64, n. 5, p. 365-372, 1950.
- Bulach, DM.; Zuerner, RL.; Wilson, P.; Seemann, T.; McGrath, A.; Cullen, PA.; Davis, J.; Johnson, M.; Kuczek, E.; Alt, DP.; Peterson-Burch, B.; Coppel, RL.; Rood, JI.; Davies, JK.; Adler, B. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential . **PNAS.**, v. 103, n. 39, p. 14560-14565, 2006.
- Chappel, R.J.; Billinghamurst, M.L.; Adler, B.; Bulach, D.M.; Khalik, D.; Mérien, F.; Serrano, M.S.; Wilson, R.J. & Perolat, P. Isolation from pigs of a pathogenic leptospire of a new genospecies and serogroup (serovar hurstbridge), and a serological study of its

- distribution and possible veterinary significance. **Proc. First Meet. Inter. Leptospirosis Soc.**, Nantes, 9-12 septembre 1996.
- Chierakul, W.; Tientadakul, P.; Suputtamongkol, Y.; Wuthiekanun, V.; Phimda, K.; Limpai boon, R.; Opartkiattikul, N.; White, NJ.; Peacock, SJ.; Day, NP. Activation of the coagulation cascade in patients with leptospirosis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 46, p. 254-260, 2008.
- Choy, HA.; M. M. Kelley, MM.; T. L. Chen, TL.; A. K. Moller, AK.; J. Matsunaga, J.; D. A. Haake, DA. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 5, p. 2441-2450, 2007.
- Croda, J.; Figueira, CP.; Wunder Jr, EA.; Santos, CS.; Reis, MG.; Ko, AI.; Picardeau, M. Targeted mutagenesis in pathogenic *Leptospira* species: Disruption of the LigB gene does not affect virulence in animal models of leptospirosis. **Infect. Immun.**, v. 76, n. 12, p. 5826-5833, 2008.
- Cullen, PA.; Haake, DA.; Adler, B. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes . **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 28, n. 3, p. 291-318, 2004.
- De Brito, T.; Prado, MJ.; Negreiros, VA.; Nicastrí, AL.; Sakata, EE.; Yasuda, PH.; Santos, RT.; Alves, VA. Detection of leptospiral antigen (*L. interrogans* serovar copenhageni serogroup Icterohaemorrhagiae) by immunoelectron microscopy in the liver and kidney of experimentally infected guinea-pigs. **Int. J. Exp. Pathol.**, v. 73, n. 5, p. 633-642, 1992.
- Dikken, H.; Kmety, E. Serological typing methods of leptospire. *In*: Bergan, T.; Norris, J. Editors, **Methods in Microbiology**, Academic Press, London 1978, p. 259-307, 1978.
- Ellis, WA. Leptospirosis. *In*: Diseases of swine. D'Allaire, S.; Mengeling, WL.; Straw, BE.; Taylor, DJ. (Eds.). Ames, IA: Iowa State University Press, 1999.
- Faine, S.; Adler, B.; Bolin, C.; Perolat, P. **Leptospira and leptospirosis** (2^a Ed.), Medisci, Melbourne, Austrália, 1999.

- Faine, S.; Stallman, ND. Amended descriptions of the genus *Leptospira* Noguchi 1917 and the species *L. interrogans* (Stimson 1907) Wenyon 1926 and *L. biflexa* (Wolbach and Binger 1914) Noguchi 1918. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 32, n. 4, p. 461-463, 1982.
- Hartman, EG.; Van den Ingh, TS.; Rothuizen, J. Clinical, pathological and serological features of spontaneous canine leptospirosis. An evaluation of the IgM - and IgG - specific ELISA. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 13, n. 3, p. 261-267, 1986.
- Hauk, P.; Macedo, F.; Romero, EC.; Vasconcellos, SA.; Morais, ZM.; Barbosa, AS.; Ho, PL. In LipL32, the major leptospiral lipoprotein, the C terminus is the primary immunogenic domain and mediates interaction with collagen IV and plasma fibronectin. **Infect. Immun.**, v. 76, n. 6, p. 2642-2650, 2008.
- Heath, SE.; Johnson, R. Leptospirosis. **J.A.V.M.A.**, v. 205, n. 11, p. 1518-1523, 1994.
- Hoke, DE.; Egan, S.; Cullen, PA.; Adler, B. LipL32 Is an extracellular matrix – interacting protein of *Leptospira* spp. and *Pseudoalteromonas tunicata*. **Infect. Immun.**, v. 76, n. 5, p. 2063-2069, 2008.
- Hung, CC.; Chang, CT.; Tian, YC.; Wu, MS.; Yu, CC.; Pan, MJ.; Vandewalle, A.; Yang, CW. Leptospiral membrane proteins stimulate pro-inflammatory chemokines secretion by renal tubule epithelial cells through toll - like receptor 2 and p38 mitogen activated protein kinase. **NDT.**, v. 21, p. 898-910, 2006.
- Hunter, P.; Leptospirosis *In*: Coetzer JAW.; Tustin, RC. **Infectious Diseases of Livestock.** Oxford University Press. 2^a Ed., vol. 3 cap. 136, p. 1445- 1456. 2004.
- Lee, SH.; Kim, KA.; Park, YG.; Seong, IW.; Kim, MJ.; Lee, YJ. Identification and partial characterization of a novel hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar lai. **Gene**, v. 254, n. 1-2, p. 19-28, 2000.
- Levett, PN. Leptospirosis, **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 14, n. 2, p. 296–326, 2001.
- Levett, PN.; Morey, RE.; Galloway, RL.; Steigerwalt, AG. *Leptospira broomii* sp. nov., isolated from humans with leptospirosis. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 56, n. 3, p. 671-673, 2006.

- Louvel, H.; S. Bommezzadri, S.; N. Zidane, N.; C. Boursaux-Eude, C.; S. Creno, S.; A. Magnier, A.; et al. Comparative and functional genomic analyses of iron transport and regulation in *Leptospira* spp. **J. Bacteriol.**, v. 188, n. 22, p. 7893-7904, 2006.
- Matsunaga, J.; Barocchi, MA.; Croda, J.; Young, TA.; Sanchez, Y.; Siqueira, I.; Bolin, CA.; Reis, MG.; Riley, LW.; Haake, DA.; Ko, AI. Pathogenic *Leptospira* species express surface - exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. **Mol. Microbiol.**, v. 49, n.4, p. 929-946, 2003.
- Matthias, MA.; Ricaldi, JN.; Cespedes, M.; Diaz, MM.; Galloway, RL.; Saito, M.; Steigerwalt, AG.; Patra, KP.; Ore, CV.; Gotuzzo, E.; Gilman, RH.; Levett, PN.; Vinetz, JM. Human leptospirosis caused by a new, antigenically unique *Leptospira* associated with a *Rattus* species reservoir in the peruvian Amazon. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 2, n. 4, p. e213, 2008.
- Merien, F.; G. Baranton, G.; Perolat, P. Invasion of Vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic *Leptospira interrogans* are correlated with virulence. **Infect. Immun.**, v. 65, n. 2, p. 729 – 738, 1997.
- Merien, F.; J. Truccolo, J.; G. Baranton, G.; P. Perolat, P. Identification of a 36-kDa fibronectin - binding protein expressed by a virulent variant of *Leptospira interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae* . **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 185, n. 1, p. 17-22, 2000.
- Merien, F.; Perolat, P. Aspects taxonomiques et diagnostiques des infections à *Leptospira* : de la sérotypie à l'approche moléculaire. **Annales de l'Institut Pasteur / actualités**. v. 4, n. 4, p. 309-316, 1993.
- Murgia, R.; Riquelme, N.; Baranton, G.; Cinco, M. Oligonucleotides specific for pathogenic and saprophytic leptospira occurring in water. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 148, n. 1, p. 27-34, 1997.
- Murray, GL.; Ellis, KM.; Lo, M.; Adler, B. *Leptospira interrogans* requires a functional heme oxygenase to scavenge iron from hemoglobin. **Microbes Infect.**, v. 10, n. 7, p. 791-797, 2008.
- Murray, GL.; Morel, V.; Cerqueira, GM.; Croda, J.; Srikrum, A.; Henry, R.; Ko, AI.; Dellagostin, OA.; Bulach, DM.; Sermswan, RW.; Adler, B.; Picardeau, M. Genome-

- wide transposon mutagenesis in pathogenic *Leptospira* spp. **Infect. Immun.**, v. 77, n. 2, p. 810-816, 2009a.
- Murray, GL.; Srikram, A.; Henry, R.; Puapairoj, A.; Sermswan, R.; Adler, B. *Leptospira interrogans* requires hemeoxygenase for disease pathogenesis. **Microbes Infect.**, v. 11, n. 2, p. 311-314, 2009b.
- Murray, GL.; Srikram, A.; Hoke, DE.; Wunder Jr, EA.; Henry, R.; Lo, M.; Zhang, K.; Sermswan, RW.; Ko, AI.; Adler, B. Major surface protein LipL32 is not required for either acute or chronic infection with *Leptospira interrogans* . **Infect. Immun.**, v. 77, n. 3, p. 952-958, 2009c
- Nahori, MA.; Fournié-Amazouz, E.; Que-Gewirth, NS.; Balloy, V.; Chignard, M.; Raetz, CRH.; Sant Girons, I.; Werts, C. Differential TLR recognition of leptospiral Lipid A and lipopolysaccharide in murine and human Cells. **J. Immunol.**, v. 175, p. 6022 – 6031, 2005.
- Nascimento, ALTO.; Ko, AI.; Martins, EAL.; Monteiro-Vitorello, CB.; Ho, PL.; Haake, DA.; Verjovski-Almeida, S.; Hartskeerl, RA.; Marques, MV.; Oliveira, MC.; Menck, CFM.; Leite, LCC.; Carrer, H.; Coutinho, LL.; Degraeve, WM.; Dellagostin, OA.; El-Dorry, H.; Ferro, ES.; Ferro, MIT.; Furlan, LR.; Gamberini, M.; Giglioti, EA.; Góes-Neto, A.; Goldman, GH.; Goldman, MHS.; Harakava, R.; Jerônimo, SMB.; Junqueira-de-Azevedo, ILM.; Kimura, ET.; Kuramae, EE.; Lemos, EGM.; Lemos, MVF.; Marino, CL.; Nunes, LR.; de Oliveira, RC.; Pereira, GG.; Reis, MS.; Schriefer, A.; Siqueira, WJ.; Sommer, P.; Tsai, SM.; Simpson, AJG.; Ferro, JA.; Camargo, LEA.; Kitajima, JP.; Setubal, JC.; Van Sluys, MA. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. **J. Bacteriol.**, v. 186, p. 2164-2172, 2004.
- Parma, AE.; Sanz, ME.; Lucchesi, PM.; Mazzonelli, J.; Petruccelli, MA. Detection of an antigenic protein of *Leptospira interrogans* which shares epitopes with the equine cornea and lens. **The Vet. J.**, v. 153, n. 1, p. 75-79, 1997.
- Perolat, P.; Chappel, RJ.; Adler, B.; Baranton, G.; Bulach, DM.; Billinghamurst, ML.; Letocart, M.; Merien, F.; Serrano, MS. *Leptospira fainei* sp. nov., isolated from pigs in Australia. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 48, n. 3, p. 851-858, 1998.

- Picardeau, M.; Bulach, DM.; Bouchier, C.; Zuerner, RL.; Zidane, N.; Wilson, PJ.; Creno, S.; Kuczek, ES.; Bommezzadri, S.; Davis, JC.; McGrath, A.; Johnson, MJ.; Boursaux-Eude, C.; Seemann, T.; Rouy, Z.; Coppel, RL.; Rood, JI.; Lajus, A.; Davies, JK.; Médigue, C.; Adler, B. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. **PLoS ONE**, v. 3, n. 2, p. e1607, 2008.
- Prescott, JF.; Zuerner, RL. *Leptospira In*: Gyles, L.; Thoen, CO. **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. Ames, Iowa University Press 2ª Ed., cap.24, p287-296, 1993.
- Ramadass, P.; Jarvis, BDW.; Corner, RJ.; Penny, D.; Marshall, RB. Genetic characterization of pathogenic *Leptospira* species by DNA hybridization. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 42, n. 2, p. 215-219, 1992.
- Ren, SX.; Fu, G.; Jiang, XG.; Zeng, R.; Miao, YG.; Xu, H.; Zhang, YX.; Xiong, H.; Lu, G.; Lu, LF.; Jiang, HQ.; Jia, J.; Tu, YF.; Jiang, JX.; Gu, WYG.; Zhang, YQZ.; Cai, Z.; Sheng, HH.; Yin, HFY.; Zhang, Y.; Zhu, GF.; Wan, M.; Huang, HL.; Qian, Z.; Wang, SY.; Ma, W.; Yao, ZJ.; Shen, Y.; Qiang, BQ.; Xia, OC.; Guo, XK.; Danchin, A.; Saint Girons, I.; Somerville, RL.; Wen, YM.; Shi, MH.; Chen, Z.; Xu, JG.; Zhao, GP. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole - genome sequencing. **Nature**, v. 422, p. 888-893, 2003.
- Ristow, P.; Bourhy, P.; McBride, FWC.; Figueira, CP.; Huerre, M.; Ave, P.; Saint-Girons, I.; Ko, AI.; Picardeau, M. The OmpA - Like protein Loa22 Is essential for leptospiral virulence. **PLoS Pathog.**, v. 3, n. 7, p. e97, 2007.
- Rohrbach, BW.; Ward, DA.; Hendrix, DVH.; Cawrse-Foss, M.; Moyers, TD. Effect of vaccination against leptospirosis on the frequency, days to recurrence and progression of disease in horses with equine recurrent uveitis. **Vet. Ophthalmol.**, v. 8, n. 3, p. 171-179, 2005.
- Schollum, LM.; Blackmore, DK. Leptospirosis of pig farmers: the results of a serological survey. **NZ. Med. J.**, v. 95, p. 299-301, 1982.

- Segers, RPAM.; Van Gestel, JA.; Van Eys, GJJM.; Van der Zeijst, BAM.; Gaastra, W.
Presence of putative sphingomyelinase genes among members of the family
Leptospiraceae. **Infect. Immun.**, v. 60, n. 4, p. 1707-1710, 1992.
- Slack, AT.; Kalambaheti, T.; Symonds, ML.; Dohnt, MF.; Galloway, RL.; Steigerwalt,
AG.; Chaicumpa, W.; Bunyaraksyotin, G.; Craig, S.; Harrower, BJ.; Smythe, LD.
Leptospira wolffii sp. nov., isolated from a human with suspected leptospirosis in
Thailand. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 58, p. 2305-2308, 2008.
- Srikram, A.; Wongratanacheewin, S.; Puapairoj, A.; Wuthiekanun, V.; Sermswan. RW.
Analyses of vaccination protocols for *Leptospira interrogans* serovar Autumnalis in
hamsters . **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 79, n. 5, p. 779-786, 2008.
- Stevenson, B.; Choy, HA.; Pinne, M.; Rotondi, ML.; Miller, MC.; DeMoll, E. ; Kraiczy,
P. ; Cooley, AE.; Creamer, TP.; Suchard, MA.; Brissette, CA.; Verma, A.; Haake, DA.
Leptospira interrogans endostatin-like outer membrane proteins bind host fibronectin,
laminin and regulators of complement. **PLoS ONE**, v. 2, n. 11, p. e1188, 2007.
- Verma, A.; Hellwage, J.; Artiushin, S.; Zipfel, PF.; Kraiczy, P.; Timoney, JF.; Stevenson,
B. LfhA, a novel Factor H - binding protein of *Leptospira interrogans*. **Infect. Immun.**,
v. 74, n. 5, p. 2659-2666. 2006.
- Vernel-Pauillac, F.; F. Merien, F. Proinflammatory and immunomodulatory cytokine
mRNA time course profiles in hamsters infected with a virulent variant of *Leptospira*
interrogans. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 7, p. 4172-4179, 2006.
- Vivian, JP.; Beddoe, T.; McAlister, AD.; Wilce, MCJ.; Zaker-Tabrizi, L.; Troy, S.; Bures,
E.; Hoke, DE.; Cullen, PA.; Lo, M.; Murray, GL.; Adler, B.; Rossjohn, J. Crystal
structure of LipL32, the most abundant surface protein of pathogenic *Leptospira* spp .
J. Mol. Biol., v. 387, n. 5, p. 1229-1238, 2009.
- Werts, C.; Tapping, RI.; Mathison, JC.; Chuang, TH.; Kravchenko, V.; Saint Girons, I.;
Haake, DA.; Godowski, PJ.; Hayashi, F.; Ozinsky, A.; Underhill, DM.; Kirschning, CJ.;
Wagner, H.; Aderem, A.; Tobias, PS.; Ulevitch, RJ. Leptospiral lipopolysaccharide
activates cells through a TLR2-dependent mechanism. **Nat. Immunol.**, v. 2, n. 4, p.
346-352, 2001.

Gênero *Leptospira* spp
FAVET - UFRGS
Prof. Marcos JP Gomes
2015

- Wohl, JS. Canine leptospirosis. **Comp. Cont. Edu. Pract. Vet.**, v. 18, p. 1215-1241, 1996.
- Yang, CW.; Hung, CC.; Wu, MS.; Tian, YC.; Chang, CT.; Pan, MJ.; Vandewalle, A. Toll-like receptor 2 mediates early inflammation by leptospiral outer membrane proteins in proximal tubule cells. **Kidney Internat.**, v. 69, p. 815-822, 2006.
- Yasuda, PH.; Steigerwalt, AG.; Sulzer, KR.; Kaufmann, AF.; Rogers, F.; Brenner, DJ. Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with proposals for seven new *Leptospira* species. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 37, n. 4, p. 407-415, 1987.

Gênero *Leptospira* spp
FAVET - UFRGS
Prof. Marcos JP Gomes
2015