

Pesquisa de leptospiros e de anticorpos contra leptospiros em animais e humanos de propriedades rurais nos biomas brasileiros Pantanal e Caatinga

Search of leptospires and of antibodies against leptospires in animals and human beings in farms in Pantanal and Caatinga Brazilian biomes

Felipe Jorge da SILVA¹; Carlos Eduardo Pereira dos SANTOS²; Talita Ribeiro SILVA¹; Glaucenyra Cecília Pinheiro SILVA¹; Sylvia Grune LOFFLER³; Bibiana BRIHUEGA³; Miguel Frederico Fernandez ALARCON¹; Vera Cláudia Magalhães CURCI⁴; Luis Antonio MATHIAS¹

¹ Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal – SP, Brasil

² Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá – MT, Brasil

³ Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária, Buenos Aires – Argentina

⁴ Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Araçatuba – SP, Brasil

Resumo

Foi investigada a ocorrência de leptospiros e de sororreatividade para leptospiros em animais e seres humanos de seis propriedades rurais localizadas em dois biomas brasileiros que apresentam condições geoclimáticas distintas: Pantanal – municípios de Miranda (MS), Itiquira (MT) e Poconé (MT) e Caatinga – municípios de Sobradinho (CE), Garanhuns (PE) e Sobral (BA). Em cada uma das propriedades, foram realizadas colheitas de sangue e de urina de animais selvagens de vida livre, animais domésticos e de seres humanos. As colheitas de materiais foram realizadas no período de fevereiro a abril de 2012 no bioma Caatinga e no período de julho a setembro de 2012 no bioma Pantanal. A reatividade sorológica contra *Leptospira* spp. foi verificada pela técnica de soroglutinação microscópica (SAM) efetuada com uma coleção de antígenos constituída por 24 sorovares de *Leptospira* spp. A pesquisa de leptospiros foi efetuada por cultivos de amostras de urina sementeadas nos meios Fletcher e de Ellinghausen – McCullough – Johnson – Harris (EMJH). Os cultivos em que houve crescimento de leptospiros foram encaminhados ao Laboratório de Leptospirose do Instituto de Patobiologia, Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária, Buenos Aires, Argentina e as estirpes de leptospiros isoladas foram genotipadas com o emprego da técnica de *Multiple Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis* (MLVA). O procedimento de tipificação empregou os VNTR 4, 7, 9, 10, 19, 23, 31, Lb4 e Lb5, que discriminam estirpes de *L. interrogans* e *L. borgpetersenii*. No Pantanal, foram examinados 17 animais selvagens, 65 animais domésticos e dois humanos. Na Caatinga, foram examinados sete animais selvagens, 100 animais domésticos e 26 humanos. Das 84 amostras de sangue examinadas no Pantanal, 47 (55,95%) foram reagentes e, das 133 da Caatinga, 59 (44,36%) foram reagentes. Pelo teste exato de Fisher, considerando-se um nível de significância de 0,05, não houve diferença entre as proporções de animais sororreagentes para *Leptospira* spp. nos dois biomas avaliados ($p = 0,063$). Os sorovares predominantes nas reações de SAM foram: 1) Pantanal – Bratislava (animais selvagens, cães e humanos); Grippotyphosa (equinos e bovinos); 2) Caatinga – Copenhageni (humanos e cães), Patoc (equinos e bovinos), Panama (ovinos e caprinos), Patoc, Copenhageni e Australis (animais selvagens). Houve isolamento de quatro estirpes de leptospiros: duas em Sobradinho, BA, *L. interrogans* sorogrupo Pomona em *Cavea aperea* e *L. interrogans* em *Euphractus sexcinctus*; e duas em Sobral, CE, *L. interrogans* em *Cerdocyon thous* e *L. interrogans* sorogrupo Pomona em *Euphractus sexcinctus*.

Palavras-chave: Leptospirose. Inquérito sorológico. Cultivos de urina. Pantanal. Caatinga.

Correspondência para:

Felipe Jorge da Silva
Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária, Buenos Aires, Argentina
R. Professor Doutor Francisco Orlando Alonso, 360
CEP 14883-358, Ribeirão Preto, SP, Brasil
e-mail: fjsepi@gmail.com

Recebido: 20/03/2014

Aprovado: 12/05/2015

Abstract

The occurrence of *Leptospira* and of seroreactivity against *Leptospira* was investigated in animals and humans from six farms located in two Brazilian biomes that have different geoclimatic conditions: Pantanal – municipalities of Miranda (MS), Itiquira (MT) and Poconé (MT) and Caatinga – municipalities of Sobradinho (BA), Garanhuns (PE) and Sobral (BA). Blood and urine samples of wildlife, domestic animals and humans were collected at each property. The samples were collected from February to April 2012 in Caatinga and from July to September 2012 in Pantanal. The serological reactivity against *Leptospira* spp. was verified by microscopic agglutination technique (MAT) made with a collection consisting by 24 antigens of *Leptospira* spp. The leptospires research was carried out by urine samples crop sown in Fletcher resources and Ellinghausen – McCullough – Johnson – Harris (EMJH). Crops with growth of leptospires were referred to the *Leptospirosis* Laboratory of the Institute of Pathobiology, National Institute of Agricultural Technology, Buenos Aires, Argentina and isolated *Leptospira* strains were genotyped with the technique of *Multiple Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis* (MLVA). The classification procedure employed the VNTR 4, 7, 9, 10, 19, 23, 31, LB4 and LB5, which discriminate strains of *L. interrogans* and *L. borgpetersenii*. In Pantanal, 17 wildlife, 65 domestic animals and two humans were examined. In Caatinga, seven wild animals were examined, along with 100 domestic animals and 26 humans. Of 84 blood samples tested in Pantanal, 47 (55.95%) were positive and, of 133 in Caatinga, 59 (44.36%) were reactant. By Fisher's exact test, considering a 0.05 significance level, there was no difference between the proportions of serum reagent animals against *Leptospira* spp. in two biome reviews ($p = 0.063$). The predominant serovars in SAM reactions were: 1) Pantanal – Bratislava (wildlife, dogs and humans), Grippotyphosa (horses and cattle); 2) Caatinga – Copenhageni (humans and dogs), Patoc (horses and cattle), Panama (sheep and goats), Patoc, Copenhageni and Australis (wildlife). Four strains of *Leptospira* were isolated: two in Sobradinho, BA, *L. interrogans* serogroup Pomona in *Cavea aerea* and *L. interrogans* in *Euphractus sexcinctus*; and two in Sobral, CE, *L. interrogans* in *Cerdocyon thous* and *L. interrogans* serogroup Pomona in *Euphractus sexcinctus*.

Keywords: Leptospirosis. Serological survey. Urine cultures. Pantanal. Caatinga.

Introdução

Embora na maioria dos países a leptospirose em seres humanos seja conhecida como uma enfermidade ocupacional, no Brasil, em áreas urbanas, ela é usualmente adquirida pelo contato com a água contaminada pela urina de animais infectados, e sua ocorrência está estreitamente associada a condições geoclimáticas, socioeconômicas e culturais (ROMERO; BERNARDO; YASUDA, 2003). No Brasil, as investigações epidemiológicas efetuadas em animais domésticos e silvestres, em diferentes ecossistemas e estações do ano, tem apresentado resultados diversos e já possibilitaram o isolamento, em diversas ocasiões, de estirpes de leptospirosas consideradas como sorovares autóctones de sorovariedades unicamente registradas no país.

Em relação a pesquisas de estirpes *Leptospira* spp. infectando animais no Brasil, Santa Rosa, Sulzer e Castro (1972) isolaram a estirpe AN 776 do rim de *Didelphis marsupialis* capturado em áreas próximas à cidade de São Paulo, SP, que foi tipificada como do sorogrupo Bataviae, sorovariedade Brasiliensis (AHMED et al., 2006). Santa Rosa, Sulzer e Castro (1972), examinando rins de bovinos abatidos no estado de

São Paulo, isolaram a estirpe do sorogrupo Sejroe, denominada Guaicurus. Vasconcellos et al. (2001) isolaram a estirpe M4/98 da urina de búfala criada em propriedade rural no Vale da Ribeira, SP, tipificada como pertencente ao sorogrupo Sejroe sorovariedade Guaicura. Corrêa et al. (2004) isolaram a estirpe M9/99 do tecido renal de *Rattus norvegicus* capturado na Fundação Parque Zoológico de São Paulo, tipificada como sorogrupo Icterohaemorrhagiae sorovariedade Copenhageni (AHMED et al., 2006; FAGUNDES et al., 2008). Freitas et al. (2004) isolaram a estirpe LO-1 da urina de um cão da cidade de Londrina, PR, tipificada como sorogrupo Canicola sorovariedade Canicola (OLIVEIRA et al., 2005; AHMED et al., 2006; FAGUNDES et al., 2008). Delbem et al. (2002) isolaram estirpe L04 do fígado de um suíno, tipificada como pertencente ao sorogrupo Canicola sorovariedade Canicola (FREITAS et al., 2004; FAGUNDES et al., 2008). Zacarias et al. (2008) isolaram a estirpe L014 da urina de um bovino abatido no estado do Paraná, tipificada como pertencente ao sorogrupo Canicola sorovariedade Canicola (AHMED et al., 2006).

Marvulo et al. (2002) isolaram as estirpes 2ACAP e 21 CAP do rim de capivaras abatidas no município de Piracicaba, SP, tipificadas como pertencentes ao sorogrupo *Grippothyphosa* sorovariedade Bananal (AHMED et al., 2006). Miraglia et al. (2008) isolaram a estirpe GR6 do rim de um suíno abatido no município de Suzano, tipificada como pertencente ao sorogrupo Pomona sorovariedade Pomona.

Em pesquisa envolvendo diversas espécies de animais selvagens na região Sudeste do Brasil, Cordeiro, Sulzer e Ramos (1981) descreveram como portadoras de *Leptospira* spp. oito espécies entre roedores e marsupiais, sendo as estirpes encontradas pertencentes aos sorogrupos Pomona, Javanica, Ballum, Panama, Australis e *Grippothyphosa*. Castro, Santa Rosa e Troise (1961) e Cordeiro e Silva (1974) também afirmaram serem os roedores, respectivamente o preá (*Cavea aperea azarea*) e o camundongo (*Mus musculus brevisstris*), um reservatório de *Leptospira* spp.

Na região amazônica, Lins e Lopes (1984) examinaram 696 animais por cultivos de tecido renal e isolaram o sorovar Ballum de um roedor do gênero *Proechimys* e de um gambá (*Didelphis marsupialis*). Também isolaram os sorovares Hebdomadis, *Grippothyphosa* e *Cynopteri* de um tatu-galinha (*Dasypus novemcinctus*). Além desses, isolaram sorovares não tipificados no estudo de um *Proechimys* e de um quati (*Nasua nasua*).

Como primeiro relato de isolamento de leptospiros em caprinos no Brasil, Lilenbaum et al. (2007) encontraram duas estirpes pertencentes ao sorogrupo *Grippothyphosa*, a M72/06-6 em uma fêmea de quatro anos e a M72/06-13 em um macho de três anos. Ainda relatando isolamento em ruminantes, Ribeiro et al. (1988) descreveram a infecção por *Leptospira interrogans* em rebanho bovino no estado de Minas Gerais.

Em humanos, Sakata et al. (1992) isolaram *Leptospira* spp., sendo, das 18 estirpes sorotipadas, 14 idênticas ao sorovar Copenhageni, duas ao sorovar Canicola, uma ao sorovar Castellonis e uma ao sorogrupo Pomona.

Em suínos, Miraglia et al. (2008) pesquisaram animais portadores em abatedouro no estado de São Paulo. Por caracterização molecular dos isolados pela análise *Multiple Locus Variable Number Tandem Repeat* (MLVA), identificaram, em uma amostra, padrão semelhante ao de *L. interrogans* sorogrupo Pomona sorovar Pomona estirpe GR6, com perfil de VNTR observado apenas no Brasil e na Argentina.

Pelo fato da leptospirose ser uma zoonose cuja cadeia epidemiológica está associada às condições climáticas, sendo que um maior número de casos usualmente ocorre durante os períodos chuvosos e em locais onde há grandes coleções de água doce, partiu-se da hipótese de que existiria diferença significativa na ocorrência de anticorpos contra *Leptospira* spp. entre os biomas Pantanal e Caatinga, uma vez que o primeiro é uma planície temporariamente inundável, com precipitação média no período das águas de 629 mm e precipitação média na seca de 75 mm, e o segundo, um ambiente onde a seca é mais acentuada, com precipitação média de 285 mm no período das águas e precipitação média de 9 mm na seca (INMET, 2014). Por esse motivo, o objetivo do presente trabalho foi investigar comparativamente a ocorrência de leptospiros e de sororreatividade para leptospiros em animais e seres humanos de propriedades rurais dos dois biomas, Pantanal e Caatinga.

Metodologia

Os municípios foram selecionados levando-se em consideração as condições de clima, relevo, hidrografia e vegetação natural, bem como suas características socioeconômicas.

No bioma Pantanal, as propriedades rurais trabalhadas estavam localizadas nos municípios de Miranda, Itiquira e Poconé, sendo a primeira no estado do Mato Grosso do Sul (MS) e as duas últimas no estado do Mato Grosso (MT). Na Caatinga, as propriedades trabalhadas estavam localizadas nos municípios de Sobral, Garanhuns e Sobradinho, respectivamente nos estados do Ceará (CE), Pernambuco (PE) e Bahia

(BA). Foi examinada uma propriedade rural por município.

Em cada propriedade trabalhada foram realizadas colheitas de sangue e urina de animais selvagens de vida livre, de animais domésticos e de seres humanos destinadas, respectivamente, à sorologia para leptospirose e ao isolamento de leptospiras. As colheitas de amostras no bioma Caatinga foram realizadas nos meses de fevereiro, março e abril de 2012, em um período de seca acentuada, sob uma precipitação menor que a normal para essa época do ano, que é de 285 mm (INMET, 2014). As colheitas de amostras no bioma Pantanal foram efetuadas nos meses de julho, agosto e setembro de 2012, época de baixo índice pluviométrico na região, porém com precipitação acima do normal para o período, que é de 75 mm (INMET, 2014). Para o presente trabalho, cada voluntário estava de acordo e assinou o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido”, referente à autorização do Comitê de Ética em Pesquisa HCRP 14630/2010. Em relação aos animais, foi concedida a autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), número de concessão 26185-1 (data da emissão: 07/02/2011 às 16h18) e autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), número de protocolo 027958/10 (data da emissão: 20 de dezembro de 2010).

As capturas dos animais selvagens de vida livre foram realizadas com armadilhas tipo “Tomarrawk”, de dimensões 45 cm de largura, 60 cm de altura e 1,20 m de profundidade. Como isca, foram utilizados atrativos como ovo, banana, linguiça calabresa e bacon; um segundo ovo, além do iscado, era quebrado no fundo da gaiola para intensificar o odor atrativo nos arredores da área de captura.

A contenção física foi realizada com uma placa de madeira de largura e altura ligeiramente menor do que as dimensões da armadilha. Essa placa funcionava como um escudo, que imobilizava o animal capturado no fundo da armadilha, de modo a tornar mais eficiente a contenção química.

Para a anestesia, foi utilizada a associação de cloridrato de tiletamina 250 mg com cloridrato de zolazepam 250 mg na dose 0,1 mL/kg pela via intramuscular. O método de contenção física dos animais domésticos foi realizado de acordo com as características anatômicas, fisiológicas e comportamentais de cada espécie, visando minimizar o estresse dos animais e garantir a segurança do pessoal envolvido nos procedimentos de contenção física. Não houve contenção química.

As colheitas das amostras de sangue foram realizadas por meio de punção da veia jugular, caudal ou cefálica, dependendo da espécie, com agulhas e seringas esterilizadas e descartáveis de tamanhos variados, dependendo da espécie. Antes e logo depois das colheitas de sangue, foi realizada assepsia do local com iodo povidine ou álcool iodado.

A urina dos animais selvagens, quando não havia micção espontânea, foi colhida pelo método de cistocentese, com assepsia prévia utilizando iodo povidine, com agulhas e seringas esterilizadas e descartáveis de tamanhos variados dependendo da espécie. No caso dos animais domésticos, como não houve anestesia, a colheita de urina foi realizada apenas quando havia micção espontânea.

Logo em seguida à colheita, foi acoplado um filtro 0,22 μ m na ponta da seringa para que, próximo a um bico de Bunsen com chama azul, fosse despejado, simultaneamente, 0,1 mL da urina filtrada em um tubo esterilizado contendo meio de cultura semissólido Fletcher – Difco^R sem antibiótico e 0,1 mL em um tubo esterilizado contendo meio de cultura líquido Ellighausen, McCullough, Johnson e Harris – Difco^R (EMJH) sem antibiótico (THIERMANN, 1980; ELLIS et al., 1982). Esses tubos foram acondicionados em recipientes fechados, ao abrigo da luz, em temperatura ambiente e avaliados semanalmente.

Para a colheita de urina, o voluntário foi orientado a colher, em tubo esterilizado e descartável tipo “falcon”, a primeira urina da manhã, desprezando o primeiro jato.

As amostras de urina foram retiradas dos tubos “falcon” com auxílio de seringas esterilizadas e descartáveis. O processamento das amostras de urina de humanos foi realizado com procedimento idêntico ao empregado com as amostras de urina dos animais.

A reatividade sorológica para *Leptospira* spp. nos soros dos animais foi verificada pela técnica de sorroaglutinação microscópica (SAM), Santa Rosa et al. (1975, 1980), sendo a diluição 1/100 considerada como ponto de corte. Os soros reagentes na triagem foram reexaminados em sete diluições seriadas de razão dois e o título da amostra correspondeu ao inverso da maior diluição com 50% das leptospiros aglutinadas por campo microscópico no aumento de 100X (SANTA ROSA et al., 1975, 1980).

As sorovariades de leptospiros utilizadas como antígenos foram estirpes de referência dos sorovares: Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Grippytyphosa, Pomona, Canicola, Hardjo, Wolffi, Tarassovi, Hebdomadis, Panama, Pomona, Pyrogenes, Shermani, Patoc, Castellonis, Bataviae, Autumnalis, Andamana, Australis, Sentot, Javanica, Bratislava, Whitcombi, Cynopteri e Butembo.

As amostras de urina foram semeadas nos meios de cultura de Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) e de Fletcher de acordo com a técnica descrita por Thiermann (1980) e Ellis et al. (1982). Ao ser confirmado crescimento de *Leptospira* spp., foi retirado 1 mL do meio de cultura Fletcher correspondente, na região do anel de crescimento, e 1 mL do meio de cultura EMJH correspondente e colocado em tubos de polipropileno de 1,5 mL estéreis descartáveis para transporte até o Laboratório de Leptospirose do Instituto de Patobiologia, Centro de Investigação em Ciências Veterinárias e Agrônômicas, do Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária (INTA), Buenos Aires, Argentina. Nesse laboratório, as leptospiros isoladas foram caracterizadas pela técnica *Multiple Locus Variable Number Tandem Repeat* (MLVA) (PAVAN et al., 2011).

As estirpes de referência e os isolados foram cultivados em meio Fletcher (Difco Laboratories) a 28°C.

Para elaboração dos moldes de DNA usados nos procedimentos de tipagem MLVA realizados com os iniciadores descritos por Majed et al. (2005) e Salaün et al. (2006), 100 µL de uma amostra da cultura foram incubados a 100°C durante 10 min. A tipagem MLVA foi realizada utilizando-se dois conjuntos de oligonucleótidos específicos para as espécies *Leptospira interrogans*, *L. borgpetersenii* e *L. kirschneri*. Os loci VNTR4, VNTR7, VNTR9, VNTR10, VNTR19, VNTR23 e VNTR31 foram usados para discriminar estirpes de *L. interrogans* (MAJED et al., 2005) e foram usados os VNTR4, VNTR7, VNTR10, LB4 e LB5 para *L. kirschneri*, *L. borgpetersenii* e para *L. interrogans* (SALAÜN et al., 2006). O volume final (50 µL) por mistura de reação continha o tampão de RCP (20 mM Tris-HCL, pH 8,4, 50 mM de KCl), trifosfatos de oxinucleoside 200 µm, 2 µm por iniciador correspondente, 2 mM de MgCl₂, 1.25U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 5 µL de DNA de modelo. Os PCRs foram realizados num Termociclador Thermo Scientific pxe – como se segue: 94°C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 s, hibridação a 55°C durante 30 s e de extensão a 72°C durante 90 s, ciclo final de 72°C durante 10 min. As amostras amplificadas (15 µL) foram reveladas por eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM de EDTA) com 0,2 µg/mL de brometo de etídio em 100V por 50 min. Bandas de DNA amplificados foram visualizados após a exposição à luz UV (Uvi Tectransiluminator BTS-20.M). Os tamanhos dos amplificados foram estimados utilizando-se o CienMarker (Biodinâmica) e o programa 2010a Gel Analyzer. Para calcular o número de repetições de cópias, foi utilizada a fórmula: Número de repetição (pb) = [tamanho dos fragmentos (pb) - regiões flanqueadas (bp)] tamanho / Tamanho da repetição (pb). Os números de repetições de cópias foram arredondados a números inteiros. Quando o número de cópias foi inferior a um, ele foi arredondado para zero.

Os genotipos obtidos foram utilizados para montar duas árvores filogenéticas com auxílio do programa

Mega Software 5.05 (TAMURA et al., 2011). A árvore foi construída pelo método *neighbor-joining*, usando sete locos marcadores para as estirpes de *L. interrogans*.

A comparação na sororreatividade para *Leptospira* spp. nos animais dos biomas Pantanal e Caatinga foi efetuada com pelo teste exato de Fisher, com auxílio do programa Epi Info 7. O nível de significância adotado foi de 0,05.

Resultados

As tabelas de 1 a 6 apresentam o número de mamíferos reagentes entre os examinados nas propriedades as sorovariedades de *Leptospira* spp. contra as quais foram encontrados títulos de anticorpos pela SAM e a tabela 7 descreve o número de animais positivos entre os examinados em cada um dos biomas.

Tabela 1 – Número de humanos e de animais reagentes em relação ao número de humanos e de animais examinados e as respectivas sorovariedades de *Leptospira* spp. contra as quais foram encontrados títulos de anticorpos pela SAM na propriedade localizada no município de Miranda, MS, Pantanal – Brasil – 2012

	Humanos	<i>C. thous</i> *	<i>P. frenata</i> *	Total
Bratislava	2	1	0	3
Javanica	0	0	1	1
Positivos	2	1	1	4
Negativos	0	0	0	0
Total	2	1	1	4

**C. thous*: *Cerdocyon thous*; *P. frenata*: *Philander frenata*

Tabela 2 – Número de humanos e de animais reagentes em relação ao número de humanos e de animais examinados e as respectivas sorovariedades de *Leptospira* spp. contra as quais foram encontrados títulos de anticorpos pela SAM na propriedade localizada no município de Itiquira, MT, Pantanal – Brasil – 2012

	Cães	Equinos	<i>E. sexcinctus</i> *	<i>N. nasua</i> *	<i>C. thous</i> *	<i>C. apella</i> *	Total
Copenhageni	0	7	0	0	0	1	8
Grippotyphosa	0	13	1	1	0	0	15
Shermani	1	0	0	1	1	0	3
Whitcombi	0	0	0	0	2	1	3
Positivos	1	20	1	2	3	2	29
Negativos	1	19	0	1	2	1	24
Total	2	39	1	3	5	3	53

**E. sexcinctus*: *Euphractus sexcinctus*; *N. nasua*: *Nasua nasua*; *C. thous*: *Cerdocyon thous*; *C. apella*: *Cebus apella*

Tabela 3 – Número de humanos e de animais reagentes em relação ao número de humanos e de animais examinados e as respectivas sorovariedades de *Leptospira* spp. contra as quais foram encontrados títulos de anticorpos pela SAM na propriedade localizada no município de Poconé, MT, Pantanal – Brasil – 2012

	Cães	Equinos	Bovinos	<i>C. thous</i> *	Total
Grippotyphosa	0	1	2	0	3
Bratislava	3	4	1	3	11
Positivos	3	5	3	3	14
Negativos	4	5	4	0	13
Total	7	10	7	3	27

**C. thous*: *Cerdocyon thous*

Tabela 4 – Número de humanos e de animais reagentes em relação ao número de humanos e de animais examinados e as respectivas sorovariedades de *Leptospira* spp. contra as quais foram encontrados títulos de anticorpos pela SAM na propriedade localizada no município de Sobradinho, BA, Caatinga – Brasil – 2012

	Humanos	Ovinos	Caprinos	<i>C. aperea</i> *	Total
Panama	0	12	12	0	24
Australis	2	0	0	1	3
Positivos	2	12	12	1	27
Negativos	3	13	13	0	29
Total	5	25	25	1	56

**C. aperea*: *Cavea aperea*

Tabela 5 – Número de humanos e de animais reagentes em relação ao número de humanos e de animais examinados e as respectivas sorovariedades de *Leptospira* spp. contra as quais foram encontrados títulos de anticorpos pela SAM na propriedade localizada no município de Garanhuns, PE, Caatinga – Brasil – 2012

	Humanos	Cães	Equinos	Bovinos	<i>E. sexcinctus</i> *	<i>C. jacchus</i> *	Total
Patoc	1	1	4	3	1	1	11
Positivos	1	1	4	3	1	1	11
Negativos	0	0	2	7	0	0	9
Total	1	1	6	10	1	1	20

**E. sexcinctus*: *E. sexcinctus*; *C. jacchus*: *Callithrix jacchus*

Tabela 6 – Número de humanos e de animais reagentes em relação ao número de humanos e de animais examinados e as respectivas sorovariedades de *Leptospira* spp. contra as quais foram encontrados títulos de anticorpos pela SAM na propriedade localizada no município de Sobral, CE, Caatinga – Brasil – 2012

	Humanos	Cães	Equinos	Ovinos	Caprinos	<i>E. sexcinctus</i> *	<i>C. thous</i> *	Total
Copenhageni	6	2	1	0	0	1	1	11
Autumnalis	0	0	0	0	0	1	1	2
Pyrogenes	0	0	0	4	4	0	0	8
Positivos	6	2	1	4	4	2	2	21
Negativos	14	1	1	12	8	0	0	36
Total	20	3	2	16	12	2	2	57

**E. sexcinctus*: *E. sexcinctus*; *C. thous*: *Cerdocyon thous*

Tabela 7 – Número de animais positivos entre os examinados nos biomas Pantanal e Caatinga – Brasil – 2012

	Examinados	Positivos	Ocorrência (%)
Pantanal	84	47	55,95%
Caatinga	133	59	44,36%
Total	217	106	48,84%

Pelo teste exato de Fisher, considerando-se um nível de confiança de 0,05, não houve diferença significativa nas proporções de animais sororreagentes para *Leptospira* spp. entre esses dois biomas ($p = 0,063$).

Não houve isolamento de *Leptospira* spp. no Pantanal.

Na propriedade pertencente ao município de Sobradinho, Bahia, Caatinga, foi isolada *Leptospira interrogans* sorogrupo Pomona de um *Cavea aperea* macho e *L. interrogans* de um *Euphractus sexcinctus* fêmea. Na última amostra não houve a identificação

do sorogrupo da espécie *L. interrogans*.

Na propriedade pertencente ao município de Sobral, Ceará, Caatinga, houve isolamento de *L. interrogans* de um *Cerdocyon thous* fêmea e de *L. interrogans* sorogrupo Pomona de um *Euphractus sexcinctus* macho. Na primeira amostra não houve a identificação do sorogrupo da espécie *L. interrogans*.

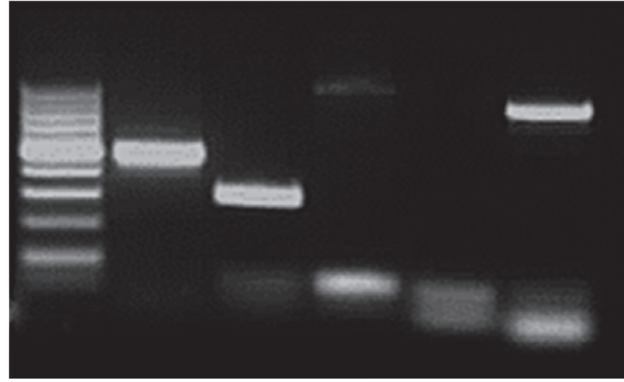
As figuras de 1 a 4 ilustram as fotos dos géis referentes às estirpes de *Leptospira* spp. isoladas nos cultivos de urina segundo a espécie animal e a localização da respectiva propriedade.

A tabela 8 apresenta o resultado da genotipificação molecular (MLVA) em cada espécie de animal infectado e também faz uma comparação com o resultado da sorologia (SAM).

Tabela 8 – Resultado da genotipificação molecular pela técnica *Multiple Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis* (MLVA) das estirpes de leptospiros isoladas da urina de animais selvagens em vida livre e da reatividade sorológica dos respectivos animais pela soroglutinação microscópica (SAM), segundo a localidade, a espécie e o sexo do animal. Estirpes isoladas no bioma da Caatinga – Brasil – 2012

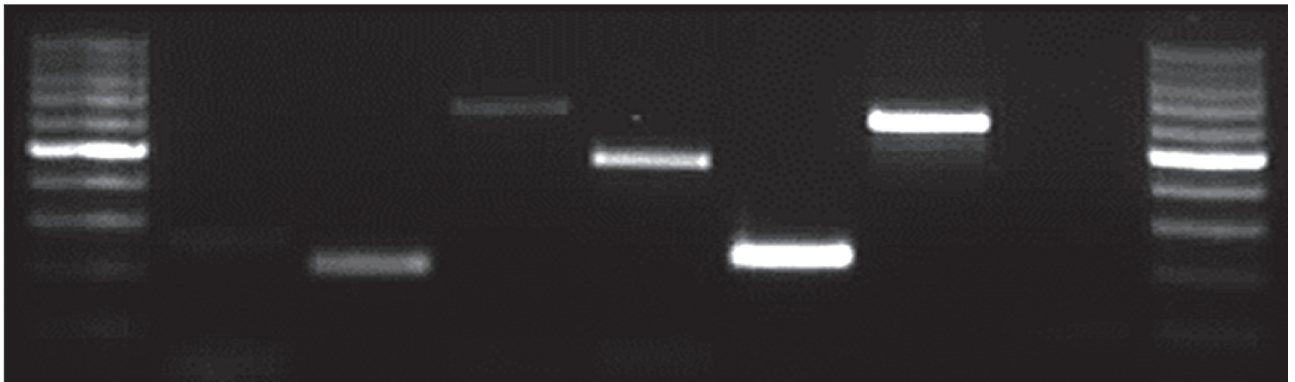
Município	UF	Espécie do animal infectado	Sexo	Resultado da genotipificação molecular	Resultado da SAM
Sobradinho	BA	<i>Cavea aperea</i>	Macho	<i>L. interrogans</i> sorogrupo Pomona	Autralis
Sobradinho	BA	<i>Euphractus sexcinctus</i>	Fêmea	<i>L. interrogans</i>	-
Sobral	CE	<i>Cerdocyon thous</i>	Fêmea	<i>L. interrogans</i>	*Cop/Aut
Sobral	CE	<i>Euphractus sexcinctus</i>	Macho	<i>L. interrogans</i> sorogrupo Pomona	*Cop/Aut

*Cop = Copenhageni/Aut = Autumnalis



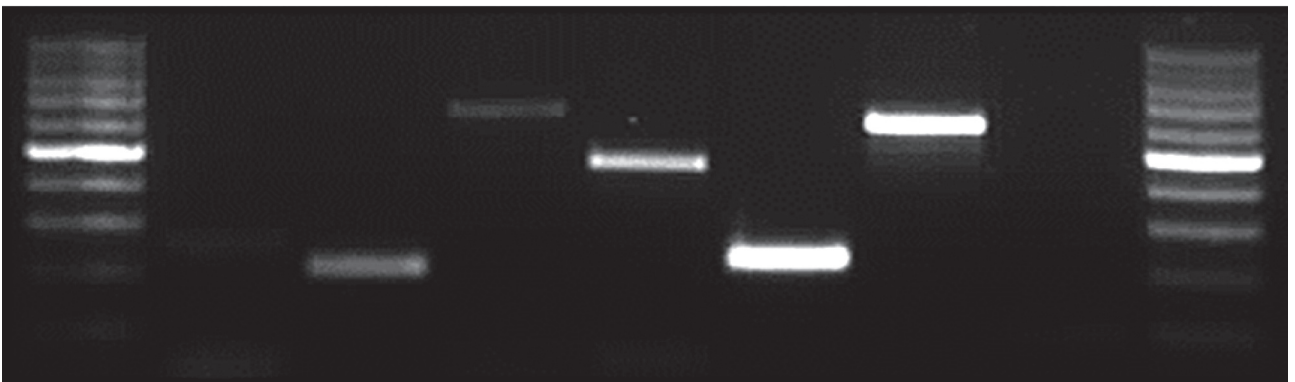
CM 4 7 10 Lb4 Lb5
 PM 471 311 993 - 785
 Cópias 1 0 12 - 3

Figura 1 – Foto do gel referente ao isolamento de *Leptospira interrogans* sorogruppo Pomona a partir da cultura de urina de um *Cavea aperea* macho na propriedade localizada no município de Sobradinho, BA, Caatinga. 2011 a 2013
 Fonte: (LOFFLER, 2013)



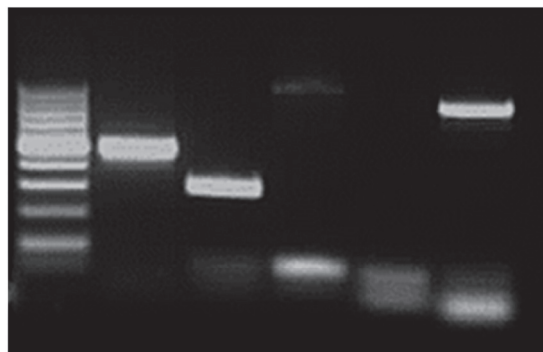
CM 4 7 9 10 19 23 31 CM
 PM 260 217 696 485 245 645 -
 Cópias 2 1 11 7 2 11 -

Figura 2 – Foto do gel referente ao isolamento de *Leptospira interrogans* a partir da cultura de urina de um *Euphractus sexcinctus* fêmea na propriedade localizada no município de Sobradinho, BA, Caatinga. 2011 a 2013
 Fonte: (LOFFLER, 2013)



CM 4 7 9 10 19 23 31 CM
 PM 260 217 696 485 245 645 -
 Cópias 2 1 11 7 2 11 -

Figura 3 – Foto do gel referente ao isolamento de *Leptospira interrogans* a partir da cultura de urina de um *Cerdocyon thous* fêmea na propriedade localizada no município de Sobral, CE, Caatinga. 2011 a 2013
 Fonte: (LOFFLER, 2013)



CM 4 7 10 Lb4 Lb5
 PM 471 311 993 - 785
 Cópias 1 0 12 - 3

Figura 4 – Foto do gel referente ao isolamento de *Leptospira interrogans* sorogruppo Pomona a partir da cultura de urina de um *Euphractus sexcinctus* macho na propriedade localizada no município de Sobral, CE, Caatinga. 2011 a 2013
 Fonte: (LOFFLER, 2013)

Discussão

Pellegrin et al. (1999) destacaram que o Pantanal Mato-Grossense proporciona condições ecológicas altamente favoráveis à ocorrência da leptospirose, uma vez que o agente sobrevive mais tempo em áreas alagadas e de temperaturas elevadas (FAINE, 1999). Os resultados sorológicos obtidos no presente trabalho em propriedades rurais do Pantanal corroboram essa afirmação. Por outro lado, não houve achados de isolamento nesse bioma, mesmo existindo nele condições ótimas para a manutenção da bactéria.

Embora ainda não haja relatos na literatura sobre as seguintes observações, a dificuldade de isolamento de leptospirose talvez possa ser explicada pelo fato de, no Pantanal, ocorrer algo que ainda não foi citado dentro das características ecológicas desse ambiente, mas que foi facilmente constatado durante os trabalhos de campo: a baixa densidade de hospedeiros. É uma característica marcante desse ambiente e que não possibilita uma condição favorável à ocorrência de casos. Embora seja um bioma de rica fauna, a densidade não é alta, principalmente porque durante seis meses do ano essa planície permanece inundada, proporcionando dispersão das populações durante este período e, dessa maneira, tornam baixas as chances de transmissão do agente.

Ao pesquisar a reatividade sorológica para *Leptospira* spp. em raposas (*Pseudalopex vetulus*) do semiárido paraibano, Azevedo et al. (2010) não encontraram animais reatores à SAM, o que difere completamente do resultado encontrado no presente estudo nas propriedades localizadas nos estados do Ceará, Pernambuco e Bahia, nas quais, além de terem sido encontrados animais selvagens de vida livre reagentes na sorologia, também houve o isolamento de leptospirose de tais animais nas áreas de caatinga dos três municípios trabalhados. Contudo, no presente estudo não foram examinados exemplares de *Pseudalopex vetulus*.

Os animais da propriedade localizada no município de Garanhuns, PE, bioma Caatinga (Tabela 5), só apresentaram reatividade sorológica contra a sorovariedade Patoc, que pertencente à espécie saprófita *Leptospira biflexa*. Apesar de não ter sido confirmada experimentalmente a infectividade desta estirpe quando oferecida na água de bebida a suínos (VASCONCELLOS et al., 1989), ela já foi isolada na Argentina em casos de abortamento em equinos (MYERS, 1976) e em bovinos nos Estados Unidos (CARROL; LE CLAIR, 1969). No Brasil, o sorovar Rannarum de *L. biflexa* foi isolado de um feto abortado de equino (YASUDA et al., 1986). Contudo, está amplamente confirmado em seres humanos que esta estirpe apresenta reações cruzadas com anticorpos induzidos

por estirpes de leptospiros patogênicas, e que tais reações podem ser inclusive mais precoces das que as determinadas pelos próprios sorovares infectantes. Portanto, no presente trabalho existe a possibilidade de que os animais reagentes para o sorovar Patoc estivessem na fase aguda de uma infecção por um sorovar patogênico ou poderiam estar infectados por um outro sorovar patogênico que não estivesse incluído na coleção de antígenos utilizada na SAM (VASCONCELLOS et al., 1989).

O presente estudo obteve isolados de *L. interrogans* sorogrupo Pomona, e resultado semelhante ao encontrado, mas em suínos, foi descrito por Miraglia et al. (2008), os quais realizaram a caracterização molecular dos isolados pela análise *Multiple Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis* (MLVA), a qual também revelou padrão semelhante ao de *L. interrogans* sorogrupo Pomona sorovar Pomona estirpe GR6.

A análise dos resultados apresentados na tabela 8 revela a ausência de correspondência entre a genotipificação das estirpes isoladas da urina dos animais com os sorovares reagentes nas provas de SAM dos respectivos animais. De fato, como o procedimento de tipificação das estirpes isoladas empregado só identificou a espécie das quatro estirpes e o sorogrupo de duas, não foram identificados os sorovares das mesmas, sendo necessário o emprego dos procedimentos clássicos para a identificação dos antígenos de superfície de natureza lipopolissacarídica, tais como a prova de absorção cruzada de aglutininas ou conjuntos de anticorpos monoclonais como já foi realizado em diversas localidades do Brasil, identificando em algumas ocasiões sorovares autóctones, só registrados até o presente unicamente no Brasil (SANTA ROSA; SULZER; CASTRO, 1972; VASCONCELLOS et al., 2001; DELBEM et al., 2002; MARVULO et al., 2002; CORRÊA et al., 2004; FREITAS et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2005; AHMED et al., 2006; FAGUNDES et al., 2008; MIRAGLIA et al., 2008; ZACARIAS et al., 2008).

A diferença não significativa na ocorrência de anticorpos contra *Leptospira* spp. entre o Pantanal e a Ca-

atinga nas propriedades rurais estudadas ($p = 0,063$) e os achados de isolamento de leptospiros na Caatinga são indicativos de que a ocorrência da leptospirose nas áreas rurais nas diversas regiões brasileiras tenha uma etiologia multifatorial, incluindo uma interação entre fatores geoclimáticos, biodiversidade animal e as práticas de manejo adotadas.

Títulos de anticorpos contra a sorovariedade Bratislava foram encontrados em duas propriedades do Pantanal, sendo que, no município de Miranda, dois humanos e um *Cerdocyon thous* foram reagentes e, no município de Poconé, animais domésticos e selvagens apresentaram reação à Bratislava. Esses achados sugerem a transmissão interespecífica do mesmo agente etiológico, principalmente a transmissão de animais selvagens para populações humanas e de animais domésticos. A sorovariedade Bratislava foi descrita por Ullmann et al. (2012) como frequente em respostas sorológicas de espécies selvagens; por Juliano et al. (2000), Homem et al. (2001), Tomich et al. (2007), Figueiredo et al. (2009) e Oliveira et al. (2010) como presente em respostas sorológicas de bovinos; por Herrmann et al. (2004) em respostas sorológicas de ovinos; por Castro et al. (2011) em respostas sorológicas de cães e por Homem et al. (2001), Aguiar et al. (2007) e Castro et al. (2011) como frequentes em respostas sorológicas de humanos, porém até o presente nunca foi isolada de qualquer espécie animal no Brasil.

Em relação a inquéritos sorológicos em bovinos no Pantanal, Pellegrin et al. (1999) encontraram animais reagentes em todas as propriedades estudadas no estado do Mato Grosso do Sul e a frequência de animais reagentes variou de 10 a 84%. Em equinos, Pellegrin, Silva e Ribeiro (1994) observaram que 100% das propriedades apresentaram animais soropositivos, sendo Icterohaemorrhagiae e Hardjo as sorovariedades mais prevalentes e, como menos prevalentes, Canicola e Pomona. Ao contrário do que se observou no presente estudo sorológico, a sorovariedade mais comumente relatada em bovinos é a Hardjo, pertencente ao sorogrupo Sejroe (JULIA-

NO et al., 2000; HOMEM et al., 2001; FAVERO et al., 2002; TOMICH et al., 2007; FIGUEIREDO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010).

A sorovariedade *Grippytyphosa* é frequentemente relatada em animais selvagens, principalmente em roedores, como *Hidrochaeris hidrochaeris*, e em marsupiais, como *Didelphis* spp. (CORRÊA, 2007). Tais espécies podem exercer papel de reservatório da sorovariedade para os animais domésticos, visto que comumente são vistos relatos de reações sorológicas em equinos (FAVERO et al., 2002) e em bovinos (JULIANO et al., 2000; HOMEM et al., 2001; TOMICH et al., 2007; FIGUEIREDO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010) em diversos estados brasileiros.

Pertencente ao sorogrupo *Grippytyphosa*, e até o presente só isolado no Brasil, está a sorovariedade Bananal. A coleção de antígenos utilizada no presente estudo não continha tal sorovariedade. É possível que tenham ocorrido reações cruzadas e que Bananal esteja presente infectando populações em áreas pantaneiras, posto que a presença de sorovarietades autóctones não são raras e já foram relatadas em estudos anteriores (SANTA ROSA; SULZER; CASTRO, 1972; VASCONCELLOS et al., 2001; DELBEM et al., 2002; MARVULO et al., 2002; CORREA et al., 2004; FREITAS et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2005; AHMED et al., 2006; FAGUNDES et al., 2008; MIRAGLIA et al., 2008; ZACARIAS et al., 2008).

Os achados sorológicos de *L. interrogans* Copenhageni obtidos em humanos na Caatinga concordam os descritos por Sakata et al. (1992). Uma estirpe autóctone de *L. interrogans* Copenhageni foi isolada por Correa et al. (2004), por Ahmed et al. (2006) e por Fagundes et al. (2008). Estudos sorológicos conduzidos por Aguiar et al. (2007), Silva et al. (2010) e também por Almeida et al. (1994), Favero et al. (2002), Corrêa et al. (2004), Tomich et al. (2007) e Ullmann et al. (2012) enfatizam a ocorrência da sorovariedade Copenhageni infectando cães e humanos no Brasil.

A afirmação de Zacarias et al. (2008) e de Corrêa (2007) de que ratos são reservatórios da sorovarietade

de Copenhageni, o relato de reações sorológicas a esta sorovariedade em espécies selvagens (ULLMANN et al., 2012) e o isolamento, de tecido renal de *Rattus norvegicus*, da estirpe M9/99 tipificada como sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* sorovariedade Copenhageni por Corrêa et al. (2004), Ahmed et al. (2006) e Fagundes et al. (2008) enfatizam os roedores como principal reservatório desta sorovariedade e alertam para sua possível transmissão para espécies domésticas e seres humanos.

As reações sorológicas observadas em pequenos ruminantes, em duas propriedades rurais da Caatinga, em especial as reações à sorovariedade Panama, concordam com as descrições de Alves et al. (1996) em caprinos na Paraíba.

O isolamento de *Leptospira interrogans* sorogrupo Pomona de um *Cavea apera* e de um *Euphractus sexcinctus*, e de *Leptospira interrogans* de um *Euphractus sexcinctus* e de um *Cerdocyon thous* são concordantes com descrição de Corrêa (2007) de que espécies selvagens são importantes reservatórios de sorovarietades de *Leptospira interrogans*.

As precárias práticas sanitárias, demasiado observadas em propriedades rurais nas diversas regiões do Brasil, tais como acúmulo de entulhos e de lixo orgânico, falta de higienização de comedouros e bebedouros dos animais, mau acondicionamento da ração e descaso à qualidade da água, favorecem a proliferação de animais sinantrópicos (ratos, preás) e de animais selvagens de vida livre (gambás, cachorros-do-mato, quatis, macacos-prego, tatus) nos arredores das propriedades e, assim, estreita-se o contato entre estes potenciais reservatórios de *Leptospira* spp. e as pessoas e seus animais domésticos. Embora a transmissão desse agente seja mais facilitada durante o período de chuvas, a presença de reservatórios selvagens em áreas rurais ocorre o ano todo, pelos fatores sanitários já mencionados, o que torna o ambiente de uma propriedade rural (pastos, piquetes, baias, cochos, salas de ordenha, galpões de ração, bebedouros) constantemente exposto a esse agente etiológico pela urina dos animais infectados, situação que possibilita cons-

tantes as chances de infecção de um hospedeiro suscetível ao longo do ano. Os resultados de isolamento obtidos, sendo todos no bioma Caatinga – local que, teoricamente, não é favorável à manutenção de leptospiros no ambiente pelas baixas umidade e pluviosidade (INMET, 2014) – justificam tal afirmação.

Resultados semelhantes em termos de aspectos epidemiológicos foram descritos por Soares et al. (2010), os quais descreveram que a incidência e a letalidade estão relacionadas com as condições socioeconômicas, independente da sazonalidade. Oliveira et al. (2012) concluíram que a oscilação do número de casos de leptospirose em rebanhos de suínos não é determinada apenas pelo índice pluviométrico, mas que outros fatores influenciam nessa dinâmica, tais como saneamento, fatores ambientais e sociais.

Barcellos e Sabroza (2001), relatando o surto em humanos de 1996 na Zona Oeste do Rio de Janeiro, verificaram que além dos locais sujeitos a inundação, as maiores taxas de incidência foram verificadas em torno de localidades de acumulação de lixo.

Ao analisarem, em diferentes épocas do ano, a flutuação da reatividade sorológica para leptospirose em animais domésticos e selvagens presentes no Campus Universitário da Unesp, Jaboticabal, SP, Silva et al. (2010) relataram a existência de influência sazonal na proporção de indivíduos sororreagentes, sendo a maior ocorrência observada durante o inverno, época em que são relatados baixos índices de umidade relativa do ar e baixos índices de pluviosidade na região. No presente trabalho, as colheitas de amostras de uri-

na no bioma Caatinga foram realizadas em um ambiente de seca marcante, sob uma precipitação menor que a normal para essa época do ano, que seria de 285 mm (INMET, 2014); no Pantanal, as colheitas foram realizadas em época do ano durante na qual ocorreram baixos índices de pluviosidade, porém com precipitação acima do normal para o período, que seria de 75 mm (INMET, 2014). Apesar disso, em ambos os biomas foram encontrados animais reagentes e, no bioma Caatinga houve isolamento de *Leptospira interrogans*.

Após investigação comparativa da ocorrência de anticorpos contra leptospiros e da ocorrência de infecção pela bactéria nos biomas Pantanal e Caatinga, pode-se aventar a hipótese de que nas áreas rurais brasileiras a ocorrência da leptospirose envolva uma cadeia epidemiológica multifatorial.

Os achados de isolamento confirmam o importante papel de espécies selvagens de vida livre como reservatórios de leptospiros para animais domésticos e para seres humanos, condição que serve de alerta para a implantação de melhorias nas práticas sanitárias adotadas nas propriedades rurais dos dois biomas investigados.

Agradecimentos

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Jaboticabal (FCAV-Unesp); à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp).

Referências

- AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; CAMARGO, L. M. A.; LABRUNA, M. B.; VASCONCELLOS, S. A.; SOUZA, G. O.; GENNARI, S. M. *Anti-Leptospira* spp and anti-Brucella spp antibodies in humans from rural area of Monte Negro municipality, state of Rondônia, Brazilian Western Amazon. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 93-96, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-83822007000100019&script=sci_arttext>. Acesso em: 12 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822007000100019>.
- AHMED, N.; DEVI, S. M.; VALVERDE, M. A.; VIJAYACHARI, P.; MACHANG'U, R. S.; ELLIS, W. A.; HARTSKEERL, R. A. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 5, n. 28, 2006. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1186%2F1476-0711-5-28#>>. Acesso em: 12 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1186/1476-0711-5-28>.
- ALMEIDA, L. P.; MARTINS, L. F. S.; BROD, C. S.; GERMANO, P. M. L. Levantamento soroepidemiológico de leptospirose em trabalhadores do serviço de saneamento ambiental em localidade urbana da região Sul do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 28, n. 1, p. 76-81, 1994. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89101994000100009>. Acesso em: 12 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89101994000100009>.
- ALVES, C. J.; VASCONCELLOS, S. A.; CAMARGO, C. R. A.; MORAIS, Z. M. Influência dos fatores ambientais sobre a proporção de caprinos soro-reatores para a leptospirose em cinco centros de criação do Estado da Paraíba, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 63, n. 2, p. 11-18, 1996.
- AZEVEDO, S. S.; SILVA, M. L. C. R.; BATISTA, C. S. A.; GOMES, A. A. B.; VASCONCELLOS, S. A.; ALVES, C. J. Anticorpos anti *Brucella abortus*, anti *Brucella canis* e anti *Leptospira* spp. em raposas (*Pseudalopex vetulus*) do semiárido paraibano, Nordeste do Brasil. **Ciência Rural**, v. 40, n. 1, p. 190-192, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782009005000232&script=sci_arttext>. Acesso em: 12 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782009005000232>.
- BARCELLOS, C.; SABROZA, P. C. The place behind the case: leptospirosis risks and associated environmental conditions in a flood-related outbreak in Rio de Janeiro. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, p. S59-S67, 2001. Supplement. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-311X2001000700014&script=sci_arttext>. Acesso em: 12 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2001000700014>.
- CARROL, R. E.; LE CLAIR, R. A. Isolation of *Leptospira* serotype Patoc from cattle in Southern California. **American Journal of Veterinary Research**, v. 30, n. 12, p. 2231-2232, 1969.
- CASTRO, A. F. P.; SANTA ROSA, C. A.; TROISE, C. *Preás (Cavia aepae azarae, Lich.) (Rodentia: Caviidae)* como reservatório de *Leptospira* em São Paulo. Isolamento de *Leptospira* icterohaemorrhagiae. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 28, p. 219-223, 1961.
- CASTRO, J. R.; SALABERRY, S. R. S.; SOUZA, M. A.; LIMA-RIBEIRO, A. M. C. Sorovares de *Leptospira* spp. predominantes em exames sorológicos de caninos e humanos no município de Uberlândia, Estado de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 2, p. 217-222, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822011000200018>. Acesso em: 12 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822011000200018>.
- CORDEIRO, F.; SILVA, I. Identification of leptospire isolated from the mouse *Mus musculus brevis* in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista de Microbiologia**, v. 5, n. 2, p. 37-41, 1974.
- CORDEIRO, F.; SULZER, C. R.; RAMOS, A. A. *Leptospira interrogans* in several wildlife species in Southeast Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 1, n. 1, p. 19-29, 1981.
- CORRÊA, S. H. R. Leptospirose. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. p. 736-741.
- CORRÊA, S. H. R.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z.; TEIXEIRA, A. A.; DIAS, R. A.; GUIMARÃES, M. A. B. V.; FERREIRA, E.; FERREIRA-NETO, J. S. Epidemiologia da leptospirose em animais silvestres na Fundação Parque Zoológico de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 3, p. 189-193, 2004. Disponível em: <<http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/6276>>. Acesso em: 12 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-95962004000300007>.
- DELBEM, A. C. B.; FREITAS, J. C.; BRACARENSE, A. P. F. R. L.; MÜLLER, E. E.; OLIVEIRA, R. C. Leptospirosis in slaughtered sows: serological and histopathological investigation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 174-177, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822002000200016>. Acesso em: 12 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822002000200016>.
- ELLIS, W. A.; O'BRIEN, J. J.; NEILL, S. D.; HANNA, J. Bovine leptospirosis: serological findings in aborting cows. **Veterinary Record**, v. 110, n. 8, p. 178-180, 1982. Disponível em: <<http://veterinaryrecord.bmj.com/content/110/8/178.abstract>>. Acesso em: 12 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1136/vr.110.8.178>.
- FAGUNDES, M. Q.; SEIXAS, F. K.; HARTWIG, D.; SILVA, E.; GRASSMANN, A. A.; DELLAGOSTIN, O. A. Tipificação de isolados de *Leptospira* pela análise de VNTR (número variável de repetições em tandem) através da eletroforese capilar. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 17., 2008, Pelotas. **Anais...** Pelotas, RS, 2008.
- FAINE, S. **Leptospira and leptospirosis**. 2nd ed. Melbourne: MedSci, 1999. 272 p.
- FAVERO, A. C. M.; PINHEIRO, S. R.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z. M.; FERREIRA, F.; FERREIRA-NETO, J. S. Sorovares de leptospirosas predominantes em exames sorológicos de bubalinos, ovinos, caprinos, equinos e cães de diversos estados brasileiros. **Ciência Rural**, v. 32, n. 4, p. 613-619, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782002000400011&lng=en&nrm=iso&tln_g=pt>. Acesso em: 12 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782002000400011>.
- FIGUEIREDO, A. O.; PELLEGRIN, A. O.; GONÇALVES, V. S. P.; FREITAS, E. B.; MONTEIRO, L. A. R. C.; OLIVEIRA, J. M.; OSÓRIO, A. L. A. R. Prevalência e fatores de risco para a leptospirose em bovinos de Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 5, p. 375-381, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-736X2009000500003&script=sci_arttext>. Acesso em: 12 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2009000500003>.
- FREITAS, J. C.; SILVA, F. G.; OLIVEIRA, R. C.; DELBEM, A. C. B.; MÜLLER, E. E.; ALVES, L. A.; TELES, P. S. Isolation of *Leptospira* spp from dogs, bovine and swine naturally infected. **Ciência Rural**, v. 34, n. 3, p. 853-856, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782004000300030>. Acesso em: 12 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782004000300030>.
- HERRMANN, G. P.; LAGE, A. P.; MOREIRA, E. C.; HADDAD, J. P. A.; RESENDE, J. R.; RODRIGUES, R. O.; LEITE, R. C. Soroprevalência de aglutininas *anti-Leptospira* spp. em ovinos nas Mesorregiões Sudeste e Sudoeste do Estado Rio Grande do

- Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 443-448, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782004000200017>. Acesso em: 12 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782004000200017>.
- HOMEM, V. S. F.; HEINEMANN, M. B.; MORAES, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; FERREIRA, F.; FERREIRA-NETO, J. S. Estudo epidemiológico da leptospirose bovina e humana na Amazônia oriental brasileira. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 2, p. 173-180, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822001000200004>. Acesso em: 12 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822001000200004>.
- INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA (INMET). **Faixa normal da precipitação trimestral**, 2014. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=clima/faixaNormalPrecipitacaoTrimestral>>. Acesso em: 16 set. 2014.
- JULIANO, R. S.; CHAVES, N. S. T.; SANTOS, C. A.; RAMOS, L. S.; SANTOS, H. Q.; MEIRELES, L. R.; GOTTSCHALK, S.; CORRÊA-FILHO, R. A. C. Prevalência e aspectos epidemiológicos da leptospirose bovina em rebanho leiteiro na microrregião de Goiânia – GO. **Ciência Rural**, v. 30, n. 5, p. 857-862, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782000000500020>. Acesso em: 12 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782000000500020>.
- LILENBAUM, W.; MORAIS, Z. M.; GONÇALES, A. P.; SOUZA, G. O.; RICHTZENHAIN, L.; VASCONCELLOS, S. A. First isolation of leptospires from dairy goats in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 507-510, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-83822007000300023&script=sci_arttext>. Acesso em: 12 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822007000300023>.
- LINS, Z. C.; LOPES, M. L. Isolation of leptospira from the wild forest animals in Amazonian-Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 1, p. 124-126, 1984. Disponível em: <<http://trstmh.oxfordjournals.org/content/78/1/124>>. Acesso em: 12 ago. 2015. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203\(84\)90191-3](http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(84)90191-3).
- MAJED, Z.; BELLEGER, E.; POSTIC, D.; POURCEL, C.; BARANTON, G.; PICARDEAU, M. Identification of variable-number tandem-repeat loci in *Leptospira interrogans* sensu stricto. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 539-545, 2005. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/content/43/2/539>>. Acesso em: 12 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.43.2.539-545.2005>.
- MARVULO, M. F. V.; PAULA, C. D.; FERREIRA, P. M.; MORAIS, Z. M.; DELBEM, A. C. B.; FAVERO, A. C. M.; MIRAGLIA, F.; CASTRO, V.; GENOVEZ, M. E.; FERRAZ, E.; PENTEADO, M.; FERREIRA-NETO, J. S.; FERREIRA, F.; VASCONCELLOS, S. A. Detection of *Leptospira* in two free living populations of capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) from São Paulo state, Brazil. In: SCIENTIFIC MEETING INTERNATIONAL LEPTOSPIROSIS SOCIETY, 3., 2002, Bridgetown. **Proceedings...** Barbados: International Leptospirosis Society, 2002. p. 62.
- MIRAGLIA, F.; MORENO, A. M.; GOMES, C. R.; PAIXÃO, R.; LIUSON, E.; MORAIS, Z. M.; MAIORKA, P.; SEIXAS, F. K.; DELLAGOSTIN, O. A.; VASCONCELLOS, S. A. Isolation and characterization of *Leptospira interrogans* from pigs slaughtered in São Paulo State, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 501-507, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822008000300017>. Acesso em: 12 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822008000300017>.
- MYERS, D. M. Serological studies and isolations of serotype hardjo and *Leptospira biflexa*, strains from horses of Argentina. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 3, n. 6, p. 548-555, 1976.
- OLIVEIRA, R. C.; FREITAS, J. C.; SILVA, F. G.; SOUZA, E. M.; DELBEM, A. C. B.; ALVES, L. A.; MÜLLER, E. E.; BALARIM, M. S.; REIS, A. C. F.; BATISTA, T. N.; VASCONCELLOS, S. A. Diagnóstico laboratorial da leptospirose em um cão utilizando diferentes técnicas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 1, p. 111-113, 2005.
- OLIVEIRA, F. C. S.; AZEVEDO, S. S.; PINHEIRO, S. R.; BATISTA, C. S. A.; MORAIS, Z. M.; SOUZA, G. O.; GONÇALES, A. P.; VASCONCELLOS, S. A. Fatores de risco para a leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no Estado da Bahia, Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 5, p. 398-402, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-736X2010000500004&script=sci_arttext>. Acesso em: 12 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2010000500004>.
- OLIVEIRA, T. V. S.; MARINHO, D. P.; COSTA NETO, C.; KLIGERMAN, D. C. Variáveis climáticas, condições de vida e saúde da população: a leptospirose no município do Rio de Janeiro de 1996 a 2009. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 17, n. 6, p. 1569-1576, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-81232012000600020&script=sci_arttext>. Acesso em: 12 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-81232012000600020>.
- PAVAN, M. E.; CAIRÓ, F.; PETTINARI, M. J.; SAMARTINO, L.; BRIHUEGA, B. Genotyping of *Leptospira interrogans* strains from Argentina by Multiple-Locus Variable-number tandem repeat Analysis (MLVA). **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 34, n. 2, p. 135-141, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147957110000457>>. Acesso em: 12 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2010.06.002>.
- PELLEGRIN, A. O.; GUIMARÃES, P. H. S.; SERENO, J. R. B.; FIGUEIREDO, J. P.; LAGE, A. P.; MOREIRA, E. C.; LEITE, R. C. **Prevalência da leptospirose em bovinos do Pantanal Mato-Grossense**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 1999. 9 p.
- PELLEGRIN, A. O.; SILVA, R. A. M. S.; RIBEIRO, S. C. Ocorrência de aglutininas anti-leptospira em equinos do Pantanal Mato-Grossense, sub-região da Nhecolândia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 23., 1994, Olinda. **Anais...** Olinda: SPEMV, 1994. p. 190.
- RIBEIRO, S. C. A.; MOREIRA, E. C.; GOMES, A. G.; VALE, C. Infecção por *Leptospira interrogans*, numa fazenda de Minas Gerais, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 40, n. 2, p. 137-144, 1988.
- ROMERO, E. C.; BERNARDO, C. C. M.; YASUDA, P. H. Human leptospirosis: a twenty-nine-year serological study in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n. 5, p. 245-248, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652003000500002&lng=en&nrn=iso&tlng=en>. Acesso em: 12 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652003000500002>.
- SAKATA, E. E.; YASUDA, P. H.; ROMERO, E. C.; SILVA, M. V.; LOMAR, A. V. Sorovares de *Leptospira interrogans* isolados de casos de leptospirose humana em São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 34, n. 3, p. 217-221, 1992. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46651992000300006>. Acesso em: 12 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46651992000300006>.
- SALAÜN, L.; MÉRIEN, F.; GURIANOVA, S.; BARANTON, G.; PICARDEAU, M. Application of multilocus variable-number tandem-repeat analysis for molecular typing of the agent of leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 11, p. 3954-3962, 2006. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/content/44/11/3954>>. Acesso em: 12 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00336-06>.

- SANTA ROSA, C. A.; SULZER, C. R.; CASTRO, A. F. P. A new leptospiral serotype in the Bataviae group, isolated in São Paulo, Brazil. **American Journal of Veterinary Research**, v. 33, n. 8, p. 1719-1721, 1972.
- SANTA ROSA, C. A.; SULZER, C. R.; GIORGI, W.; SILVA, A. S.; YANAGUITA, R. M.; LOBÃO, A. O. *Leptospiriosis* in wildlife in Brazil: isolation of a new serotype in pyrogenes group. **American Journal of Veterinary Research**, v. 36, n. 9, p. 1363-1365, 1975.
- SANTA ROSA, C. A.; SULZER, C. R.; YANAGUITA, R. M.; SILVA, A. S. *Leptospiriosis* in wildlife in Brazil: isolation of serovars canicola, pyrogenes and grippotyphosa. **International Journal of Zoonoses**, v. 7, p. 40-43, 1980.
- SILVA, F. J.; MATHIAS, L. A.; MAGAJEVSKI, F. S.; WERTHER, K.; ASSIS, N. A.; GIRIO, R. J. S. Anticorpos contra *Leptospira* spp. em animais domésticos e silvestres presentes no campus universitário da FCAV, Unesp, Jaboticabal/SP. **Ars Veterinária**, v. 26, n. 1, p. 17-25, 2010. Disponível em: <<http://www.arsveterinaria.org.br/index.php/ars/article/view/290>>. Acesso em: 12 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.15361/2175-0106.2010v26n1p017-025>.
- SOARES, T. S. M.; LATORRE, M. R. D. O.; LAPORTA, G. Z.; BUZZAR, M. R. Análise espacial e sazonal da leptospirose no município de São Paulo, SP, 1998 a 2006. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, n. 2, p. 283-291, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0034-89102010000200008&script=sci_arttext>. Acesso em: 12 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89102010000200008>.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. Mega5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011. Disponível em: <<http://mbe.oxfordjournals.org/content/28/10/2731>>. Acesso em: 12 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msr121>.
- THIERMANN, A. B. *Canine leptospirosis* in Detroit. **American Journal of Veterinary Research**, v. 41, n. 10, p. 1659-1661, 1980.
- TOMICH, R. G. P.; BOMFIM, M. R. Q.; KOURY, M. C.; PELLEGRIN, A. O.; PELLEGRIN, L. A.; KO, A. I.; BARBOSA-STANCIOLI, E. F. *Leptospiriosis* serosurvey in bovines from Brazilian Pantanal using IGG ELISA with recombinant protein LipL32 and microscopic agglutination test. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 674-680, 2007.
- Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-83822007000400017&script=sci_arttext>. Acesso em: 12 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822007000400017>.
- ULLMANN, L. S.; NETO, N. D.; TEIXEIRA, R. H. F.; NUNES, A. V.; SILVA, R. S.; PEREIRA-RICHINI, V. B.; LANGONI, H. Epidemiology of leptospirosis at Sorocaba Zoo, São Paulo state, Southeastern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 11, p. 1174-1178, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2012001100017>. Acesso em: 12 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2012001100017>.
- VASCONCELLOS, S. A.; OLIVEIRA, J. C. F.; MORAIS, Z. M.; BARUSELLI, P. S.; AMARAL, R.; PINHEIRO, S. R.; FERREIRA, F.; FERREIRA-NETO, J. S.; SCHÖNBERG, A.; HARTSKEERL, R. A. Isolation of *Leptospira santarosai*, serovar Guaricura from buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Vale do Ribeira, São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 298-300, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822001000400008>. Acesso em: 12 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822001000400008>.
- VASCONCELLOS, S. A.; OHTSUBO, I.; MORETTI, A. S. A.; ITO, F. H.; PASSOS, E. C.; CÔRTEZ, J. A. Ausência de resposta imunológica humoral em suínos que receberam água de beber contaminada com *Leptospira biflexa* estirpe Buenos Aires. **Revista de Microbiologia**, v. 20, n. 1, p. 56-61, 1989.
- VASCONCELLOS, S. A.; OHTSUBO, I.; YASUDA, P. H.; MORETTI, A. S.; ITO, F. H.; PASSOS, E. C.; CÔRTEZ, J. A.; MORENO, A. G. Emprego do antígeno de *L. biflexa* estirpe Buenos Aires para o diagnóstico sorológico da leptospirose em suínos experimentalmente infectados com *L. interrogans* sorotipo Pomona. **Revista de Microbiologia**, v. 20, n. 1, p. 62-70, 1989.
- YASUDA, P. H.; SULZER, C. R.; GIORGI, W.; SOARES, G. *Leptospira biflexa* sorotipo Ranarum isolado de feto abortado de equino. **Revista de Microbiologia**, v. 17, n. 1, p. 25-27, 1986.
- ZACARIAS, F. G. S.; VASCONCELLOS, S. A.; ANZAI, E. K.; GIRALDI, N.; FREITAS, J. C.; HARTSKEERL, R. Isolation of leptospira serovars Canicola and Copenhageni from cattle urine in the state of Paraná, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 484-488, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822008000400028>. Acesso em: 12 ago. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822008000400028>.