

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



NEFRITE INTERSTICIAL CRÓNICA EM BOVINOS - EXAME *POST MORTEM*

JOANA SEQUEIRA COSTA

ORIENTADOR:

Doutor João Paulo Leite Ferreira

COORIENTADORA:

Doutora Maria Gabriela Lopes Veloso

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



NEFRITE INTERSTICIAL CRÓNICA EM BOVINOS - EXAME *POST MORTEM*

JOANA SEQUEIRA COSTA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JURI:

PRESIDENTE:

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

VOGAIS:

Doutor Jorge Manuel de Jesus Correia

Doutor João Paulo Leite Ferreira

ORIENTADOR:

Doutor João Paulo Leite Ferreira

COORIENTADORA:

Doutora Maria Gabriela Lopes Veloso

DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA TESE OU DISSERTAÇÃO

Nome: JOANA SEQUEIRA COSTA

Título da Tese ou Dissertação: _____

Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas públicas): _____

Designação do curso de

Mestrado ou de

Doutoramento:

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

Clínica

Produção Animal e Segurança Alimentar

Morfologia e Função

Sanidade Animal

Declaro sobre compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

- Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
- Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de 6 meses, 12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial*;

* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três):

- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE/TRABALHO (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
- DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 12 de fevereiro de 2021

(indicar aqui a data da realização das provas públicas)

Assinatura: _____

Agradecimentos

Este foi um percurso extremamente difícil, com muitos altos e baixos, que exigiu um esforço constante e uma perseverança inimaginável. Com muita força de vontade e com a preciosa ajuda de todos os que me acompanharam, chego, por fim, à etapa final da concretização de um sonho.

Quero agradecer à Professora Maria Gabriela Veloso, que me aceitou orientar desde o primeiro momento, que tudo fez para que o estágio se concretizasse e que ao longo de todo este tempo se mostrou, acima de tudo, muito paciente, mantendo-se sempre disponível, revelando um elevado profissionalismo e empatia pelo sucesso de uma aluna que um professor deve ter. Ao Professor João Cota, que sem ele não poderia ter contribuído para este projeto, com propósitos tão interessantes e pertinentes para a sociedade. Ao Dr, João Ferreira, que me acompanhou incansavelmente durante todo o estágio, fazendo sempre todos os esforços possíveis para que a minha experiência se tornasse tão rica quanto possível. Pela sua disponibilidade, paciência e tolerância, por tudo o que me ensinou, o meu sincero agradecimento. A estes meus professores, as minhas três grandes alavancas académicas, obrigada por todas as explicações, toda a solidariedade, toda a disponibilidade e por todas as palavras de apoio e de motivação.

À minha mãe, ao meu pai, a todos os meus familiares que, num momento ou noutro estiveram sempre lá, nunca deixando de acreditar em mim. Uns, que me acompanharam desde o início, outros, que mais recentemente se uniram à família. Todos eles tiveram um papel crucial para que me mantivesse firme neste projeto.

À avó Ana. À avó Palmira. A estas duas grandes mulheres, que tanto lutaram e que tanto desejam ver os seus netos seguir o seu rumo na vida.

Um especial obrigado à minha família do coração. Às minhas amigas, que sempre me incentivaram a continuar, e a nunca desistir. Cada uma com a sua palavra distinta, cada uma com a sua criatividade para me desafiar a pensar “fora da caixa”. A evoluir.

A todas estas pessoas, às quais um agradecimento por escrito parece muito pouco, um enorme obrigada.

Resumo

A Leptospirose é uma zoonose reemergente globalmente disseminada e de elevada relevância em todo o mundo. Particularmente em contextos ocupacionais, tem importância em trabalhos agrícolas ou profissões que impliquem contacto com animais que possam estar infetados, como explorações de bovinos ou matadouros. É responsável por perdas económicas em explorações de ruminantes, devido principalmente a alterações reprodutivas. O principal objetivo deste trabalho foi estudar a possível relação entre as lesões renais encontradas em bovinos que foram motivo de reprovação durante a inspeção *post mortem*, e as infeções por espécies patogénicas de *Leptospira*. Foram selecionados aleatoriamente entre março e julho de 2018, num matadouro da DAV de Setúbal, 40 rins com lesões de nefrite intersticial crónica, bem como 10 rins sem lesões, que constituíam o grupo de controlo. Os bovinos a partir dos quais se recolheram os rins pertenciam a 26 explorações diferentes da Região de Setúbal. Recolheram-se amostras desses rins, submetendo-as a análise histopatológica e a PCR convencional para pesquisa de ADN de espécies patogénicas de *Leptospira*. Para isso foi feita a amplificação do gene *lipL32*. Como controlo positivo foi utilizado ADN de *Leptospira interrogans* sorogrupo Icterohaemorrhagiae sorovar Copenhageni, e como controlo interno o gene β -actina de bovino. Os resultados histopatológicos confirmaram a presença de nefrite intersticial nos rins reprovados. Dos 40 rins recolhidos com lesões, 10 revelaram-se positivos, pertencendo os bovinos positivos a apenas 2 explorações. É esperado que este trabalho seja mais um contributo para o estudo epidemiológico da Leptospirose bovina em Portugal.

Palavras-chave: bovino, *Leptospira*, *lipL32*, nefrite, zoonose

Abstract

Leptospirosis is a reemerging zoonosis that is globally disseminated and highly relevant worldwide. Particularly in occupational contexts, it is important in agricultural work, or professions that involve contact with animals that may be infected, such as cattle farms or in slaughterhouses. It is responsible for economic losses in ruminant farms, mainly due to reproductive changes. The main objective of this work was to study the possible relationship between kidney lesions found in cattle which were condemned during *post-mortem* inspection, and infections by pathogenic *Leptospira* species. Between March and July 2018, at a slaughterhouse in Setúbal, 40 kidneys with lesions compatible with chronic interstitial nephritis were selected at random, as well as 10 kidneys without lesions, which constituted the control group. The cattle from which the kidneys were collected belonged to 26 different farms in the Setúbal Region. Samples of these kidneys were collected and submitted to histopathological analysis and conventional PCR for DNA screening for pathogenic *Leptospira* species. *lipL32* gene was amplified. DNA from *Leptospira interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae serovar Copenhageni was used as positive control, and the bovine β -actin gene was used as internal control. Histopathological results confirmed the presence of interstitial nephritis in the condemned kidneys. From the 40 kidneys collected with lesions, 10 were positive, with positive cattle belonging to only 2 herds. This work is expected to be one more contribute for the epidemiological study of bovine Leptospirosis in Portugal.

Keywords: bovine, *Leptospira*, *lipL32*, nephritis, zoonosis

Índice

Agradecimentos	I
Resumo	II
Abstract	III
Índice.....	IV
Índice de figuras	VI
Índice de tabelas	VII
Índice de gráficos	VIII
Lista de abreviaturas e siglas	IX
Lista de unidades e símbolos.....	X
1. Introdução	1
1.1. Relatório de atividades.....	4
2. Revisão Bibliográfica.....	7
2.1. Fisiologia do Rim.....	7
2.1.1. Estruturas protetoras do rim.....	8
2.1.2. Reação do rim aos agentes agressores.....	8
2.2. Lesões renais.....	9
2.2.1. Distúrbios da circulação.....	9
2.2.2. Doença tubular.....	10
2.2.2.1. Necrose tubular aguda ou “acute tubular injury”.....	10
2.2.3. Doença túbulo-intersticial.....	11
2.2.3.1. Nefrite	12
2.2.3.2. Nefrite intersticial	12
2.3. Leptospirose.....	13
2.3.1. Epidemiologia.....	13
2.3.2. Classificação Taxonómica.....	14
2.3.3. <i>Leptospira</i>	16
2.3.4. Fisiopatologia.....	17
2.3.5. Mecanismos imunológicos.....	19
2.3.6. Leptospirose em animais.....	19
2.3.7. Diagnóstico em animais	21
2.3.7.1. Métodos sorológicos	21
2.3.7.2. Pesquisa de <i>Leptospira</i>	22

3. Material e métodos.....	22
3.1. Objetivos do estudo.....	22
3.2. Colheita de amostras.....	23
3.3. Análise histopatológica.....	23
3.4. Extração de ácidos nucleicos.....	24
3.5. Desenho dos oligonucleótidos iniciadores e protocolo de PCR.....	24
3.6. Análise Estatística.....	24
4. Resultados.....	24
5. Discussão.....	26
5.1. Pesquisa do gene <i>lipL32</i>	28
5.2. Frequência de <i>Leptospira</i> como causa de nefrite intersticial crónica.....	30
5.3. Leptospirose em bovinos.....	31
5.4. Importância do Diagnóstico.....	31
5.5. Prevalência de <i>Leptospira</i>	33
5.6. Situação em Portugal.....	34
5.7. Causas mais frequentes da reprovação de rins de bovino.....	35
5.8. Controlo e prevenção.....	36
6. Conclusão.....	38
Bibliografia.....	39

Índice de figuras

Figura 1 – Dois rins de Bovino, com petéquias; as setas e as representações ovais assinalam, respetivamente, as petéquias e zonas de hemorragias mais intensas (Fotografias originais).....	10
Figura 2 – A: White Spotted Kidney (SESC 2020); B: lesões focais de nefrite intersticial; uma das lesões foi cortada, notando-se que a zona branca se estende para o interior do córtex (Fotografia original).....	13
Figura 3 – Comparação entre a membrana externa das bactérias Gram-negativas e das espiroquetas em particular, onde se inclui Leptospira (Baseado em Teodoro 2009)	16
Figura 4 – Observação da infiltração de células mononucleadas no interstício.....	25

Índice de tabelas

Tabela 1 – Comparação das características da infecção por <i>Leptospira</i> no hospedeiro de manutenção e no hospedeiro acidental (baseado em Constable et al. 2017).....	20
Tabela 2 – Resultados da pesquisa por PCR do gene <i>lipL32</i> de <i>Leptospira</i> . $p = 0,179$	25
Tabela 3 – Resultados da pesquisa por PCR do gene <i>lipL32</i> de <i>Leptospira</i> de acordo com o género $p = 0,092$	25
Tabela 4 – Frequência de resultados positivos e negativos de acordo com intervalos de idades.....	26

Índice de gráficos

Gráfico 1 – Casos reportados de Leptospirose humana em Portugal entre 2007 e 2018 (ECDC 2017).....	3
--	---

Lista de abreviaturas e siglas

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

DAV – Divisão de Alimentação e Veterinária

DGAV – Direção Geral de Alimentação e Veterinária

ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

EUA – Estados Unidos da América

FMV- ULisboa – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa

HACCP – Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos (*Hazard Analysis and Critical Control Point*)

IRA – Insuficiência Renal Aguda

IRC – Insuficiência Renal Crónica

IRCA – Informações Relativas à Cadeia Alimentar

LPS – Lipopolissacáridos

MLST – *Multi-Locus Sequence Typing*

MLVA – *Multi-Locus Variable Number Tandem-Repeat Analysis*

MRE – Matérias de Risco Especificadas

MVO – Médico Veterinário Oficial

MIMV – Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

NTA – Necrose tubular aguda

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (*Polimerase Chain Reaction*)

PME – Proteínas da membrana externa

RT-PCR – PCR em tempo real (*Real-time PCR*)

SIPACE – Sistema de Informação do Plano de Aprovação e Controlo dos Estabelecimentos

TAM – Teste de Aglutinação Microscópica (*Microscopic Agglutination Test*)

TCR – Túbulos Contornados Renais

TFG – Taxa de Filtração Glomerular

WSK – White Spotted Kidney (Rim com manchas brancas)

Lista de unidades e símbolos

μm – Micrómetro

kDa – Quilodalton, unidade de massa atómica

1. Introdução

Para a conclusão do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, realizei um estágio curricular na área de Inspeção Sanitária, focado principalmente nas atividades médico-veterinárias em contexto de matadouro. Os objetivos principais foram a aprendizagem de todos os procedimentos práticos a cargo do Médico Veterinário Oficial (MVO), bem como a consolidação de conhecimento científico e técnico necessário à execução dos mesmos. Paralelamente, foi feito um estudo anatomo-patológico e laboratorial, em que foram observados e analisados rins de bovino reprovados durante a inspeção *post mortem*. O objetivo era pesquisar, através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), a presença do gene *lipL32*, característico de leptospiros patogénicas. Foram recolhidos aleatoriamente rins que evidenciavam lesões de nefrite intersticial crónica, com o intuito de averiguar se existiam bovinos infetados com leptospiros patogénicas, na região de origem dos mesmos. Os resultados obtidos neste estudo permitirão alertar para questões de saúde pública, incentivando a implementação de vacinação dos animais contra a Leptospirose, para proteger os profissionais sujeitos a elevado risco de contágio. Apesar de existir, para seres humanos, a vacina contra a Leptospirose, ela não é muito usada no nosso país.

A inspeção sanitária é uma atividade que está implementada em todos os Estados Membros da União Europeia, de forma sistemática, em toda a área alimentar, constituindo um conjunto de práticas médico-veterinárias que têm um papel determinante na segurança sanitária dos géneros alimentícios. Está regulada por legislação comunitária e nacional. Os documentos legais referidos ao longo deste trabalho enquadram-se na legislação que estava em vigor no decorrer do estágio curricular. Alguns desses documentos foram entretanto revogados e substituídos, outros foram alterados, com o objetivo de uniformizar e atualizar o quadro legislativo geral. Atualmente estão em vigor, entre outros, o Regulamento (UE) 2017/625 de 15 de março, que visa “assegurar a aplicação da legislação em matéria de géneros alimentícios e alimentos para animais e das regras sobre saúde e bem-estar animal, fitossanidade e produtos fitofarmacêuticos” e, em conformidade, o Regulamento Delegado (UE) 2019/624 de 8 de fevereiro, “relativo a regras específicas aplicáveis à realização de controlos oficiais da produção de carne e às zonas de produção e de afinação de moluscos bivalves vivos”, e o Regulamento de Execução 2019/627 de 15 de março que “estabelece disposições práticas uniformes para a realização dos controlos oficiais de produtos de origem animal destinados ao consumo humano”.

O Regulamento 178/2002 do Parlamento e do Conselho “determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios”.

O Regulamento (CE) n.º 854/2004 de 29 de abril do Parlamento e do Conselho estabelece regras específicas de organização dos controlos oficiais de produtos de origem animal destinados ao consumo”. Como parte integrante das competências do Médico Veterinário, a inspeção sanitária é um importantíssimo pilar na defesa da saúde pública, sendo alguns dos seus objetivos a saúde e bem-estar animal e a redução da prevalência de doenças zoonóticas. Garantir a segurança sanitária dos géneros alimentícios colocados no mercado, e possibilitar o seu consumo sem causar doença, é essencial nas sociedades modernas. É também importante proteger os trabalhadores de todo o setor agroalimentar dos perigos biológicos presentes nos géneros alimentícios, desde os animais ou matérias-primas, até ao produto final. Para prevenir que as zoonoses apareçam neste contexto laboral, existe um largo espectro de medidas, sendo a adoção de boas práticas de higiene baseadas nos princípios HACCP e a vigilância as preocupações centrais. O Decreto-Lei n.º 84/1997 de 16 de abril “estabelece as regras de protecção dos trabalhadores contra os riscos de exposição a agentes biológicos durante o trabalho”, incluindo medidas como avaliação de riscos, formação dos trabalhadores em matéria de higiene e métodos de trabalho, utilização sistemática de equipamentos de protecção individual, realização regular de exames médicos de rotina e se possível vacinação dos trabalhadores, limpeza, desinfeção e manutenção de instalações e equipamentos segundo protocolos definidos e com os respetivos registos e ainda a aplicação de dispositivos de controlo de pragas.

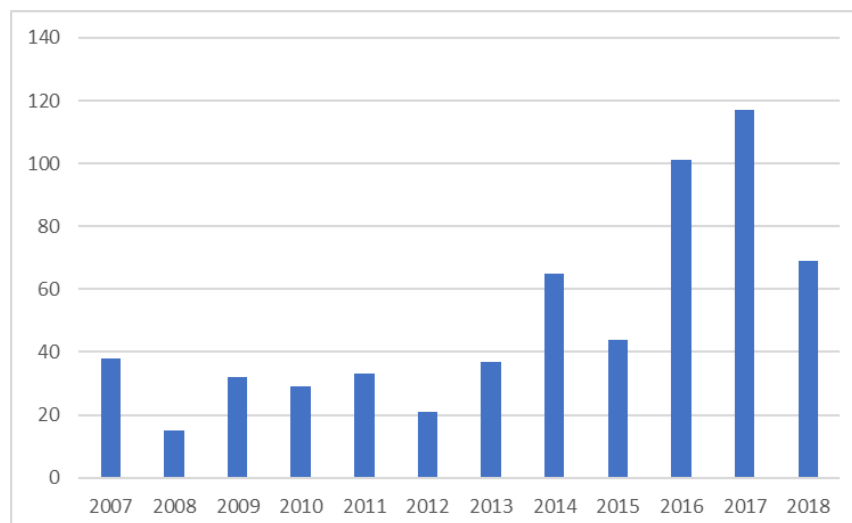
Entre as inúmeras doenças que têm vindo a gerar crescente preocupação, a Leptospirose é uma delas. Doença reemergente, mundialmente distribuída, que pode atingir diversas espécies animais, incluindo o Homem e as espécies pecuárias. O número total de sorovares reconhecidos é já de 300, dos quais 250 são patogénicos, e estes números têm tendência a aumentar (Cerqueira and Picardeau 2009; Picardeau 2017). A infeção por *Leptospira* ocorre através de feridas na pele e pelas mucosas, por contacto com fontes contaminadas. Esta bactéria é excretada na urina de animais infetados, principalmente de roedores, que constituem o principal hospedeiro intermediário da doença, contaminando todo o ambiente. O controlo de pragas em estabelecimentos da área alimentar é um importante método para impedir a propagação da doença. No entanto, os roedores estão sempre presentes tanto em zonas rurais como urbanas, contaminando o ambiente com urina, que é depois amplamente disseminada através da água das chuvas, das regas, dos fomites e de qualquer curso de água. Certas profissões que impliquem proximidade com estas fontes contaminadas acarretam um risco acrescido de contágio para a Leptospirose. Esta doença é por isso uma das zoonoses a vigiar em função da situação epidemiológica, como consta no Decreto-Lei n.º 193/2004 e está também incluída na lista de zoonoses ocupacionais do Decreto Regulamentar n.º 6/2001. Esta lista refere que quaisquer trabalhos em zonas infestadas por roedores ou profissões que impliquem o contacto com animais são

susceptíveis de provocar a doença, nomeadamente trabalhos em matadouros, talhos, peixarias, trabalhos de preparação de alimentos e, naturalmente, médicos veterinários.

Leptospira pode ser eliminada pela dissecação, extremos de pH ou pelo calor (50°C durante 10 minutos ou 10 segundos a 60°C). É sensível a baixas concentrações de cloro (Greenwood et al. 2012). Para o controlo da Leptospirose, as empresas do setor alimentar têm obrigatoriamente de manter implementados programas de controlo de pragas, nomeadamente de roedores (Regulamento (CE) Nº 852/2004), além dos naturalmente implementados princípios de boas práticas de higiene, entre os quais a limpeza frequente e sistemática de equipamentos, bancadas e pavimentos com produtos como hipoclorito de sódio, que assegura a eliminação de *Leptospira*. Fernandes et al. (2019) pesquisaram anticorpos para *Leptospira interrogans* em trabalhadores do Saneamento Básico da Região de Lisboa e Vale do Tejo, com ausência de resultados positivos. Esse estudo, que envolveu também um inquérito aos trabalhadores testados, revelou que os mesmos estavam pouco alertados para esta zoonose, mas bastante cientes das regras de boas práticas de higiene e proteção individual.

Em Portugal, tem-se verificado um aumento dos casos reportados de Leptospirose humana nos últimos anos (gráfico 1). A maioria dos surtos verificam-se no arquipélago dos Açores, onde a associação de um clima favorável (com elevada precipitação) com a elevada densidade de roedores cria condições ótimas para a sobrevivência da bactéria (Moreira 2012). As autoridades sanitárias dos Açores têm vindo a adotar medidas extraordinárias para combater a doença, nomeadamente através da prevenção, controlo e redução da presença de roedores invasores e comensais, como estabelecido no Decreto Legislativo Regional n.º 31/2010/A.

Gráfico 1 – Casos reportados de Leptospirose humana em Portugal entre 2007 e 2018
(ECDC 2017)



Seguidamente serão apresentadas com mais detalhe as atividades desenvolvidas durante o estágio, e enquadradas legalmente. A revisão bibliográfica começa por introduzir conceitos de patologia renal e por explicar os mecanismos que originam diferentes alterações no rim, direcionando-nos para as causas mais frequentes de reprovação de rins de bovino. Entre essas causas temos a nefrite intersticial crónica, que pode ter diversas etiologias, nomeadamente a Leptospirose. Esta doença será abordada na segunda parte da revisão bibliográfica, de forma a enquadrar as atividades laboratoriais realizadas.

1.1. Relatório de atividades

O estágio curricular realizou-se entre os dias 7 de fevereiro de 2018 e 31 de julho de 2018, com uma carga horária de 30 horas semanais. O estágio teve como orientador o Dr. João Ferreira, MVO pertencente ao Corpo de Inspeção Sanitária da Divisão de Alimentação e Veterinária (DAV) de Setúbal, e como coorientadora a Prof.^a Dr.^a Maria Gabriela Veloso, docente na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa. O estágio decorreu em 2 matadouros, um que abate suínos, bovinos e pequenos ruminantes, e outro que abate apenas suínos. Teve como objetivos principais observar e participar diariamente em todas as tarefas de inspeção atribuídas ao MVO segundo o Regulamento (CE) n.º 854/2004, colaborando principalmente com o orientador, mas também com os restantes MVO e Auxiliares de Inspeção. Pontualmente, um terceiro matadouro foi também local de estágio, o que me permitiu ter uma perceção mais global das diferenças entre estabelecimentos de abate, principalmente no que diz respeito ao grau de modernização de instalações e equipamentos, à intensidade da produção e a métodos de trabalho. De acordo com a colocação do orientador na rotatividade prevista na DAV de Setúbal, foi ainda possível acompanhá-lo em auditorias a instalações de desmancha, queijarias e a um estabelecimento de preparação e embalagem de refeições pré-confecionadas.

As obrigações legais do MVO estão estabelecidas em vários normativos legais, comunitários e nacionais, nomeadamente o Regulamento (CE) n.º 854/2004. Neste regulamento são descritas as várias funções do MVO, nomeadamente tarefas de auditoria, tarefas de inspeção e de fiscalização das marcas de salubridade. Os controlos oficiais que visam assegurar o cumprimento da legislação no que diz respeito a alimentos para animais e a géneros alimentícios, bem como à saúde e bem-estar dos animais, são também funções do MVO que estão estabelecidas no Regulamento (CE) n.º 882/2004 de 29 de abril. O Regulamento (CE) n.º 852/2004 estabelece regras gerais relativamente à higiene dos géneros alimentícios e o Regulamento (CE) n.º 853/2004 “estabelece regras específicas para os operadores das empresas do sector alimentar no que se refere à higiene dos

gêneros alimentícios de origem animal”, e complementa o anterior. O MVO representa a autoridade que garante o cumprimento destas regras, para assegurar um elevado nível de proteção do consumidor no que diz respeito à segurança destes gêneros alimentícios.

Segundo o Capítulo I do Anexo I do Regulamento (CE) n.º 854/2004, compete ao MVO realizar tarefas de auditoria, garantindo que se cumpram sempre as boas práticas de higiene, segundo o sistema de análise de perigos e controlo dos pontos críticos (HACCP). Neste âmbito, periodicamente eram realizadas auditorias no matadouro por um membro do Corpo de Inspeção, para garantir que os operadores aplicavam os procedimentos segundo os princípios HACCP, nomeadamente no que diz respeito à higiene antes, durante e após o abate, manutenção das instalações e equipamentos, higiene do pessoal e controlo de temperaturas. Além destas auditorias, que ficavam registadas, a execução dos procedimentos por parte dos operadores, bem como as condições das instalações e dos equipamentos eram sistematicamente observados pelo MVO, sendo feitas as devidas advertências sempre que necessário, de forma a proteger a carne de qualquer contaminação fecal ou de outra origem.

O MVO é também responsável por executar tarefas de inspeção, nomeadamente verificar as Informações Relativas à Cadeia Alimentar (IRCA), fazer a inspeção *ante mortem* e *post mortem*, assegurar o bem-estar animal e a remoção e separação das matérias de risco especificadas (MRE) e de outros subprodutos animais, e ainda controlar os testes laboratoriais (Regulamento (CE) 854/2004).

Em contexto diário, no matadouro, o abate começava após o controlo dos documentos de acompanhamento de todos os lotes de animais a abater (guias de transporte para abate imediato, IRCA, passaportes), e da respetiva inspeção *ante mortem*. Da IRCA constam informações pertinentes em relação aos animais que chegam para abate, tais como o estatuto sanitário da exploração de origem, os tratamentos aplicados aos animais nos últimos seis meses, com as respetivas datas e intervalos de segurança, a presença de doenças que comprometam a segurança da carne, resultados relevantes de análises no âmbito da vigilância e controlo de resíduos e zoonoses, e os contatos do médico veterinário que assiste o operador da exploração (Regulamento (CE) n.º 853/2004). Para cumprir os objetivos do exame *ante mortem* procurava, acompanhando o MVO, algum sinal que indicasse que o bem-estar animal estava comprometido, bem como a presença de algum fator que pudesse ter consequências negativas para a saúde humana ou animal, com especial atenção para a deteção de doenças zoonóticas, como indicado no Regulamento (CE) 854/2004. Era importante, em primeiro lugar, confirmar a correspondência dos lotes com as respetivas guias, tendo por base a distribuição dos lotes nos parques e observando as marcas de identificação dos animais. Observava-se o estado higio-sanitário dos animais,

nomeadamente os lotes com um grau de sujidade inaceitável. Na presença de lotes nestas condições, era exigido que os animais fossem lavados e só depois poderiam ser aprovados para abate. Para avaliar as condições de bem-estar animal e o estado de saúde, verificava se existiam animais doentes ou incapazes de se levantar. Segundo o Regulamento 1099/2009 do Conselho de 24 de setembro, quando os animais não se conseguem deslocar pelos seus próprios meios, têm que ser abatidos e sangrados no local, com a ajuda de dispositivos de atordoamento portáteis. Verificava também se o número de animais por parque não era excessivo e se existia água disponível, tal como exige o Regulamento (CE) 1099/2009. Esta última situação muitas das vezes não estava salvaguardada, porque os bebedouros não estavam adequadamente acessíveis aos animais. Era também avaliada a forma como os abegões dirigiam os animais, exigindo-se que movimentassem os animais tranquilamente e de forma a não lhes causar stress desnecessário, através da utilização de instrumentos elétricos, cumprindo as regras operacionais contidas no Anexo III do Regulamento (CE) Nº 1099/2009. Ainda no âmbito de garantir o bem-estar animal, é de salientar que os Auxiliares de Inspeção são responsáveis por fazer regularmente auditorias ao transporte dos animais, executando um controlo documental e verificando as condições em que os animais chegam ao matadouro e a forma como são transferidos para as abegoarias.

Durante o exame *post mortem* era feita sistematicamente a inspeção visual de todas as vísceras e carcaças. A palpação e a incisão eram feitas, no caso dos suínos, somente se necessário, de acordo com as indicações do Regulamento (CE) 219/2014 de 7 de março. A maior parte do estágio nos matadouros foi passado a realizar inspeção *post mortem* sob a supervisão do MVO, para desenvolver técnicas eficazes e rápidas de incisão e observação da carcaça e vísceras, mas sobretudo para aprender a reconhecer lesões suspeitas de doenças infecciosas, para que pudesse tomar as decisões sanitárias acertadas e de modo consciente.

O Regulamento (CE) N. 2075/2005 da Comissão de 5 de dezembro, que “estabelece regras específicas para os controlos oficiais de deteção de triquinias na carne”, obriga o MVO a observar o resultado dos testes, realizados segundo o método de digestão enzimática, para pesquisa de *Trichinella spiralis* em suínos, efetuado a partir de amostras dos pilares do diafragma de todos os animais abatidos.

Outra das obrigações do MVO era verificar a remoção, separação e marcação de subprodutos e de matérias de risco especificadas (MRE). Durante o estágio tive a oportunidade de observar os locais onde eram colocados os vários subprodutos, com as respetivas marcações. Tive ainda a oportunidade de praticar a remoção do tronco cerebral em bovinos e em pequenos ruminantes, e respetivo acondicionamento para envio ao

laboratório, situação que está prevista no Regulamento (CE) 999/2001 de 22 de maio, no âmbito da vigilância e diagnóstico de Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis.

A decisão final do MVO acerca da salubridade das carnes é fundamentada nas inspeções *ante e post mortem*, bem como nos resultados dos testes laboratoriais. Os resultados da inspeção sanitária dos animais abatidos são diariamente observados e registados no sistema informático SIPACE.

O Regulamento (CE) N.º 882/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de abril de 2004 “relativo aos controlos oficiais realizados para assegurar a verificação do cumprimento da legislação relativa aos alimentos para animais e aos géneros alimentícios e das normas relativas à saúde e ao bem-estar dos animais”, constitui um guia documental em matéria de auditorias. No seu artigo 10.º, este regulamento refere os métodos, técnicas e as atividades que se exigem ao MVO auditor. Durante o estágio acompanhei o orientador nas suas auditorias a queijarias, salas de desmancha e empresas de transformação de produtos. Assim, foi possível perceber como se inicia, como se conduz e encerra uma auditoria, e os objetivos principais das auditorias de acompanhamento. Compreendi quais os aspetos mais importantes a avaliar, nomeadamente no que diz respeito ao estado das instalações, à aplicação dos princípios de boas práticas de higiene por parte dos trabalhadores e às práticas de registo e identificação de matérias primas e produtos confeccionados (garantindo a rastreabilidade). O acompanhamento em auditorias também serviu para saber avaliar a documentação exigida e reconhecer todas as informações importantes a incluir nos relatórios. Constituiu ainda um alerta para entender a postura que um auditor deve ter, sendo que são essenciais tanto os conhecimentos científicos e competências práticas, como certos atributos pessoais de ética, diplomacia, percetividade, autonomia, autoconfiança e poder de decisão, tal como nos direciona a Norma Portuguesa ISO 19011 2012.

Entre os vários objetivos deste estágio destacam-se a aquisição de competências técnicas e práticas na área de Inspeção Sanitária, enquadrando, consolidando e aprofundando os conhecimentos científicos estudados ao longo do MIMV nestas matérias.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Fisiologia do rim

2.1.1. Estruturas protetoras do rim

O rim possui algumas barreiras que impedem o acesso e a ação perigosa de agentes infecciosos ou químicos às várias partes do nefrônio. Nos glomérulos, o endotélio dos capilares glomerulares é fenestrado e coberto com glicoproteínas carregadas negativamente, impedindo a passagem de macromoléculas aniônicas (com mais de 70 kDa) presentes no sangue para a fenda de filtração e conseqüentemente para o espaço urinário. A membrana basal glomerular é constituída por colagénio tipo IV e glicoproteínas aniônicas, o que também permite separar substâncias com base no tamanho e carga. Por sua vez, os podócitos, células epiteliais especializadas do folheto visceral da Cápsula de Bowman, formam prolongamentos secundários que estão implicados na manutenção da carga negativa da membrana basal glomerular. Entre os prolongamentos secundários dos podócitos existe o diafragma de filtração, composto por nectina, que regula o tamanho da fenda de filtração (Zachary 2017; Junqueira and Carneiro 2013).

As células mesangiais fazem parte do sistema mononuclear fagocitário, tendo por isso, entre outras funções, a de fagocitar e digerir substâncias retidas pela barreira de filtração, tais como complexos antigénio-anticorpo (Junqueira and Carneiro 2013). Nos Túbulos Contornados Renais (TCR), a membrana basal impede a passagem de bactérias provenientes do trato urinário inferior para o interstício renal. No interstício encontram-se os elementos responsáveis pela resposta imunitária celular e humoral.

2.1.2. Reação do rim aos agentes agressores

Os diversos fatores que podem lesionar o tecido renal agrupam-se em pré-renais, renais ou pós-renais. Os fatores pré-renais implicam a redução da Taxa de Filtração Glomerular (TFG), secundária nomeadamente a falência circulatória cardíaca ou periférica. Os fatores renais incluem glomerulonefrite, nefrite intersticial, podendo resultar de toxinas, sépsis ou choque hemorrágico. As bactérias, as toxinas bacterianas ou os êmbolos tumorais podem causar vasculite oclusiva nos vasos renais. Os fatores pós-renais estão relacionados com alterações das vias urinárias, que impedem o normal escoamento de urina, como a urolitíase. Os mecanismos preponderantes no desenvolvimento de insuficiência renal aguda são a obstrução intratubular, diminuição da TFG e refluxo do filtrado glomerular e vasoconstrição intrarrenal (Constable et al. 2017; Zachary 2017).

As alterações patológicas nos glomérulos ocorrem muitas vezes devido à deposição de imunocomplexos, êmbolos bacterianos ou trombos, ou infeção direta viral ou bacteriana. Estes fatores provocam espessamento das membranas, necrose e infiltração de leucócitos. A inflamação e destruição da membrana basal pode ser responsável por hiperfiltração

transglomerular. Agentes etiológicos graves ou prolongados no tempo estão na origem de glomeruloesclerose e atrofia secundária dos TCR. Na fase inicial da doença renal pode ser possível reconhecer as estruturas que primeiro sofrem alterações e os fatores específicos implicados, como é o caso da necrose do epitélio tubular pela ação de toxinas ou a deposição de complexos auto-ímmunes nos glomérulos. No entanto, à medida que a doença evolui, a perda de nefrónios deixa de ter relação direta com a causa inicial, sendo que, em estados mais avançados a tendência é observarem-se padrões lesionais semelhantes, independentemente da etiologia. A doença renal crónica em fase final caracteriza-se pela alteração das várias estruturas do rim, podendo ser impossível determinar a causa inicial. O rim torna-se fibrosado e diminui de volume (Cianciolo and Mohr 2015; Zachary 2017).

2.2. Lesões renais

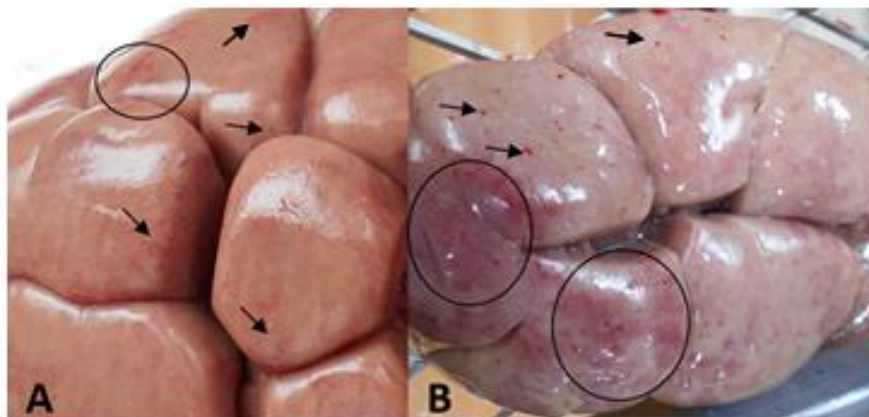
As alterações macroscópicas possíveis de se observar em rins têm diversas etiologias, estando relacionadas com alterações do desenvolvimento, alterações vasculares (como hemorragias e enfartes), inflamatórias ou degenerativas. A maioria das lesões renais que se encontram nos animais domésticos, incluindo os animais de produção, são reações inflamatórias, quistos congénitos e hidronefrose. Menos comuns são as neoplasias primárias (van Dijk et al. 2007).

2.2.1. Distúrbios da circulação

A hiperémia está presente na nefrite aguda. A congestão aguda nos rins é vista nas enterotoxémias por clostrídeos em cordeiros e bezerros, como resultado de hemorragias intertubulares. Os rins com hiperémia ou congestão apresentam-se escuros e aumentados (Cianciolo and Mohr 2015).

As hemorragias encontradas no parênquima renal são usualmente petéquiias, hemorragias punctiformes na cortical, resultantes da rotura de vasos sanguíneos (figura 1). As causas são diversas, nomeadamente bacteriémia, virémia ou intoxicação por plantas do género *Quercus*. São comuns no córtex renal e podem até aparecer em animais saudáveis, o que se constata durante a inspeção *post mortem* de rins de bovinos saudáveis (Cianciolo and Mohr 2015, Zachary 2017).

Figura 1 – Dois rins de Bovino, com petéquias; as setas e as representações ovais assinalam, respetivamente, as petéquias e zonas de hemorragias mais extensas (Fotografias originais)



2.2.2. Doença tubular

Nos túbulos contornados renais, as células epiteliais podem sofrer alterações como resposta a várias etiologias, tais como: infeções ascendentes ou hematógenas; isquémia; enfarte ou ação direta por toxinas. Como consequência, a membrana basal pode sofrer rutura ou espessamento. Na presença de uma agressão leve e furtiva, o epitélio tubular tem potencial para sofrer hiperplasia e restaurar a sua função. A isquémia, se grave ou prolongada, origina normalmente lesões irreversíveis na membrana basal. O citoesqueleto das células dos túbulos sofre alterações estruturais significativas, tais como a perda da bordadura em escova e perda da polaridade celular, podendo originar necrose e perda funcional permanente dos segmentos tubulares. Se a perda de células for demasiado extensa, o potencial de regeneração é insuficiente e, portanto, a reparação dos tecidos implica formação de tecido fibroso. Quando alguns nefrónios ficam irreversivelmente perdidos, os túbulos contornados dos nefrónios são afetados e sofrem hipertrofia compensatória de modo a salvaguardar a função renal global (Zachary 2017).

2.2.2.1. Necrose tubular aguda ou “acute tubular injury”

A necrose tubular aguda (NTA) pode incluir também lesões degenerativas afetando os TCR, em particular os túbulos contornados proximais (Constable et al. 2017). Atualmente, a expressão “necrose tubular aguda” é mais utilizada do que “nefrose”, embora possa levar a pensar que para que se desenvolvam distúrbios funcionais no rim, é necessário haver necrose evidente das células tubulares. De facto, as lesões podem restringir-se apenas a degenerescência, com tumefação celular das células dos túbulos. A referência “lesão

tubular aguda” (“acute tubular injury”) seria a mais indicada, uma vez que remete para um distúrbio funcional que pode causar azotemia significativa sem que haja necrose de liquefação ou de coagulação (Cianciolo and Mohr 2015).

No rim, os túbulos contornados proximais são as estruturas mais sensíveis a produtos tóxicos ou à carência de oxigênio, devido às complexas funções metabólicas que desempenham. Consequentemente, as lesões degenerativas observam-se principalmente nos túbulos contornados, mas também nos glomérulos (Zachary 2017; Constable et al. 2017). Ocorrem em casos de septicemia, intoxicações, anóxia, especialmente em casos de choque e quando há acumulação de certas substâncias ou depósitos anormais (van Dijk et al. 2007). Muitos agentes infecciosos são responsáveis pela necrose tubular, entre os quais bactérias como *Leptospira* spp. (Zachary 2017). Certas substâncias como os aminoglicosídeos, os antineoplásicos ou produtos químicos como o etanol ou metais pesados são drogas nefrotóxicas que causam necrose tubular. Portanto, a NTA pode ser do tipo tóxico (endógeno ou exógeno) ou isquêmico. As células necrosadas destacam-se da membrana basal e acumulam-se no lúmen dos TCR, formando cilindros. O reconhecimento macroscópico de necrose tubular aguda é muitas das vezes difícil. À superfície de corte o córtex pode apresentar estriações brancas opacas, orientadas radialmente, devido à necrose de coagulação. A medula é pálida ou difusamente congestionada (Constable et al. 2017; Zachary 2017).

A necrose tubular aguda é o fenômeno mais importante no desenvolvimento de insuficiência renal aguda. A morte das células causa vasoconstrição glomerular, o que juntamente com a formação de cilindros vai contribuir para a diminuição da TFG, originando oligúria ou anúria. A evolução pode ser fatal, em casos em que as lesões atingem a maioria dos tubos. Nos casos menos graves as lesões podem ser reversíveis, permitindo uma recuperação integral da estrutura tubular. A integridade da membrana basal das células dos tubos contornados é determinante para a sua regeneração e depende da natureza do agente patogénico. Certas causas de necrose, como a hipóxia, implicam fragmentação da membrana basal das células tubulares, desenvolvendo-se fibrose no interstício renal, o que impede a regeneração. Por vezes em casos de necrose pela presença de substâncias químicas nefrotóxicas, a membrana basal é respeitada, sendo possível a sua reconstituição integral (Zachary 2017).

2.2.3. Doença túbulo-intersticial

A inflamação que inicia no tecido conjuntivo de suporte do rim como uma lesão primária designa-se nefrite intersticial. Pode ser infecciosa ou não infecciosa, aguda, subaguda ou crónica. O interstício renal acaba por estar sempre significativamente

envolvido na doença renal, quer seja devido a doença intersticial primária, quer seja subsequente à lesão tubular. Isto pode acontecer porque uma lesão nas células tubulares e a sua consequente necrose inicia uma resposta inflamatória no interstício. Por este motivo é comum usar-se a designação de doença túbulo-intersticial, caracterizando um grupo de doenças inflamatórias que envolvem os túbulos e o interstício. A Leptospirose bovina é uma das causas de nefrite túbulo-intersticial aguda (Zachary 2017).

2.2.3.1. Nefrite

Nefrite aguda é o termo correntemente usado para designar o processo inflamatório no rim, caracterizando-se por hiperémia da vasculatura intersticial, vasodilatação, edema e infiltrados celulares. O rim torna-se brilhante, hipertrofiado e vermelho-escuro. A hiperémia está presente na fase inicial da inflamação em processos septicémicos ou toxémicos de origem bacteriana. Os agentes infecciosos podem atingir o rim por via ascendente, a partir do ureter, por via hemática, através do filtrado glomerular e por penetração direta. A via ascendente ocorre na presença de uma infeção do trato urinário inferior, que normalmente está associada a piómetra, contaminação do trato genital por fezes ou contaminação dermatológica (dermatite perivulvar) (Zachary 2017).

2.2.3.2. Nefrite intersticial

A nefrite intersticial não supurativa pode ser aguda ou crónica e focal ou difusa, dependendo da intensidade da agressão e da eficácia da resposta do hospedeiro. Caracteriza-se por início clínico agudo e histologicamente por edema intersticial, infiltração leucocitária e necrose tubular focal. Na nefrite intersticial crónica, há infiltração de células mononucleares, fibrose intersticial e atrofia tubular generalizada. Muitos agentes infecciosos são capazes de causar nefrite intersticial não supurativa, nomeadamente *Leptospira*. A forma mais conhecida de nefrite intersticial multifocal não supurativa é o “rim com manchas brancas”, ou “White Spotted Kidney” (WSK), comum em bezerros jovens (figura 2). Os rins afetados apresentam várias pequenas áreas brancas com até 1 cm de diâmetro, em todo o córtex. Podem aparecer áreas maiores que se projetam na superfície capsular e aderem à cápsula. Histologicamente, a lesão inicial corresponde a um infiltrado purulento que vai rapidamente sendo substituído por numerosos linfócitos e alguns plasmócitos e macrófagos (Cianciolo and Mohr 2015). Nas lesões crónicas avançadas existe atrofia dos nefrónios e fibrose intensa, com diminuição do volume do rim e diminuição crítica da função renal (Zachary 2017).

Figura 2 – A: White Spotted Kidney (SESC 2020); B: lesões focais de nefrite intersticial; uma das lesões foi cortada, notando-se que a zona branca se estende para o interior do córtex
(Fotografia original)



2.3. Leptospirose

2.3.1. Epidemiologia

Descrita desde o século XIX, a Leptospirose é atualmente a zoonose mais comum no mundo, encontrando-se amplamente distribuída, particularmente nas regiões tropicais e subtropicais, onde se verificam a maioria dos casos e de mortes em humanos. É endêmica na maioria das áreas urbanas e atinge todos os anos mais de um milhão de pessoas, estando relacionada com o clima húmido e com as más condições socioeconómicas das populações. Nas regiões tropicais a Leptospirose é uma das principais causas de insuficiência renal aguda em humanos (Yang et al. 2019). A doença pode ser fatal se existir doença pulmonar grave e consequente falência respiratória (WHO 2003). É também comum em animais domésticos, incluindo animais de produção, e normalmente o quadro é subclínico (Constable et al. 2017; Yang et al. 2019). *Leptospira* é uma espiroqueta presente nos túbulos renais dos mamíferos, sendo transmitida através da urina, principalmente por roedores. Penetra através das mucosas e feridas na pele por contato com água contaminada, atingindo a circulação sanguínea (Cianciolo and Mohr 2016).

Este microrganismo consegue sobreviver no ambiente por longos períodos e qualquer mamífero pode tornar-se portador (Greenwood et al. 2012). No hospedeiro de manutenção a transmissão ocorre de forma direta, pelo contato com a urina, produtos do aborto, leite ou por transmissão venérea ou transplacentária. As zonas contaminadas com urina de animais portadores são uma fonte de contaminação indireta, e podem atingir hospedeiros acidentais (Cianciolo and Mohr 2015). A adaptação das várias espécies de

Leptospira depende da resposta de cada hospedeiro a cada sorovar em particular (Constable et al 2017).

As manifestações clínicas de Leptospirose humana são altamente variáveis na sua forma e intensidade. Pode mimetizar outras doenças, tais como o dengue, brucelose, malária, infeções pelo vírus *Influenza* e outras doenças hemorrágicas virais, exigindo por isso, sempre, a confirmação laboratorial para que se chegue ao diagnóstico (WHO 2003).

A prevenção da doença começa com o saneamento básico nas sociedades, incluindo abastecimento adequado de água, adequado tratamento dos esgotos e existência de contentores para o lixo, com a respetiva remoção diária. É também conveniente educar a população para as questões sanitárias e fazer o controlo dos roedores, principalmente nas zonas domésticas. Estas preocupações têm maior relevância em ambientes rurais socioeconomicamente pobres (Moreira 2012; PAHO 2014). O diagnóstico é importante para determinar o estatuto imunológico de uma população em programas de controlo e erradicação da doença. As medidas de controlo também incluem a identificação de focos de água contaminada, eliminação de roedores e vacinação dos animais domésticos (Ellis 2015). A maioria dos países em vias de desenvolvimento não têm programas de vigilância epidemiológica continuada, sendo que os já escassos dados recolhidos nessas zonas são, muitas das vezes, pouco fidedignos (Moreira 2012).

2.3.2. Classificação Taxonómica

É complexa a classificação e a nomenclatura de *Leptospira*. Existem dois sistemas de classificação, um baseado em características fenotípicas e outro, em genotípicas. Na classificação fenotípica, considerada a classificação clássica, o género *Leptospira* divide-se em dois grupos ou complexos: um que engloba as leptospiros patogénicas, que se associam a um hospedeiro, *Leptospira interrogans (sensu lato)*, e outro onde estão incluídas as leptospiros não patogénicas ou saprófitas, de vida livre, *L. biflexa* (Greenwood et al. 2012; Moreira 2012; Constable et al. 2017). As necessidades nutricionais, bem como certas propriedades fenotípicas distinguem os dois grupos (Cerqueira and Picardeau 2009). As leptospiros saprófitas têm capacidade de se multiplicar a 13°C e na presença de 8-azaguanina, ao contrário das leptospiros patogénicas. Tanto as leptospiros patogénicas como as saprófitas incluem estirpes com variações antigénicas observadas em reações sorológicas e, nesta base, classificam-se as leptospiros em sorótipos ou sorovares. Na classificação sorológica clássica o grupo taxonómico de base é o sorovar, definido pela estrutura antigénica de superfície, através do Teste de Aglutinação Microscópica (TAM). Sorovares antigenicamente idênticos agrupam-se em sorogrupos (Moreira 2012; Ferreira 2015; Constable et al. 2017).

Os recentes avanços nas técnicas moleculares têm alterado a taxonomia das bactérias, especialmente bactérias fastidiosas como *Leptospira*, surgindo uma classificação mais precisa, genotípica, com base no teste hibridação de ADN-ADN. O número de espécies de *Leptospira* está assim a aumentar, sendo já de 35. Surgiu então uma divisão em três grupos, com base na patogenicidade das espécies: saprófitas, intermédias e patogénicas. Mantiveram-se as designações de *L. interrogans* e *L. biflexa*, mas com significados ligeiramente diferentes, que podem originar alguma confusão na nomenclatura. Em sentido lato, *L. interrogans* e *L. biflexa* eram anteriormente dois complexos que englobavam cada um deles diferentes espécies de leptospiros. Atualmente, passaram a representar espécies específicas, encaixadas cada uma delas em dois dos três grupos. Assim, em sentido estrito, *L. interrogans* é uma espécie de *Leptospira* patogénica e *L. biflexa* é uma espécie saprófita (Ferreira 2015; Vincent et al. 2019).

Atualmente a classificação taxonómica clássica de *Leptospira*, baseada nas variações antigénicas, não tem estatuto taxonómico oficial, mas revela-se de elevada importância para uso laboratorial (Moreira 2012; Ferreira 2015; Constable et al. 2017). A relação entre as características sorológicas e genotípicas das diferentes leptospiros é fraca, e pode revelar-se de difícil compreensão. Algumas leptospiros diferentes em termos genéticos podem apresentar determinantes antigénicos semelhantes. Por outras palavras, um sorovar ou sorogrupo pode ser encontrado em diferentes espécies genotípicas. Exemplo disso é o sorovar Hardjo, reconhecido nas espécies patogénicas *L. borgpetersenii* e *L. interrogans*, mas também na espécie saprófita *L. meyeri*. Os sorovares antigenicamente idênticos Hardjo-bovis e Hardjo-prajitno são agora classificados em duas espécies genotípicas diferentes: *L. borgpetersenii*, para o sorovar Hardjo-bovis, e *L. interrogans* (*sensu stricto*), para o sorovar Hardjo-prajitno. Noutra perspetiva, leptospiros patogénicas e saprófitas podem englobar-se na mesma espécie genotípica. Os vários sorovares do sorogrupo Bataviae podem ser encontrados em espécies como *L. interrogans*, *L. santarosai*, *L. kirschneri*, *L. noguchii* e *L. borgpetersenii* (Cerqueira and Picardeau 2009; Cianciolo and Mohr 2015; Constable et al. 2017).

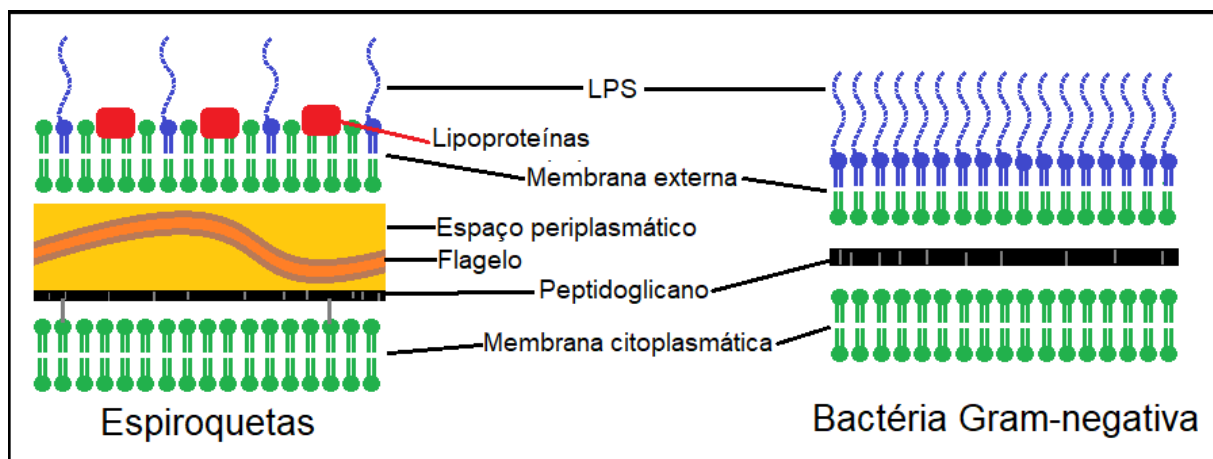
A recente classificação molecular é importante porque tem por base as características genotípicas do organismo, permitindo uma organização taxonómica mais correta e precisa. No entanto, é considerada pouco prática pelos microbiologistas clínicos. Uma vez que os sorovares estão associados a certos hospedeiros e a certas regiões, a identificação sorológica é essencial para estudos epidemiológicos e para o desenvolvimento de estratégias de prevenção adequadas (Cerqueira and Picardeau 2009). A taxonomia sorológica continua, por isso, a ser amplamente utilizada (Constable et al. 2017).

2.3.3. *Leptospira*

Leptospira, do grego *leptos*, “fino”, e do latim *spira* (enrolado) é uma delgada espiroqueta, flexível e filamentosa, formando uma estrutura helicoidal. Possui uma extremidade em gancho e dois flagelos com inserções polares, que lhe conferem movimentos de rotação e translação (Greene et al. 2012; Moreira 2012; Valencia 2014; Yang et al. 2019). É uma bactéria móvel, aeróbia estrita, com comprimento entre 6 e 20 μm . Tem um diâmetro muito pequeno (0,1 μm), o que lhe permite atravessar certas barreiras normalmente intransponíveis por outras bactérias (Greenwood 2012; Constable et al. 2017; Yang et al. 2019). As condições ótimas para a sobrevivência e crescimento de *Leptospira* são temperatura entre 28°C a 30°C, presença de humidade e ambientes neutros ou ligeiramente alcalinos. Nestas condições, a bactéria consegue sobreviver por semanas ou meses em solos húmidos ou águas estagnadas. Em condições adversas a sua viabilidade perde-se em minutos (Cianciolo and Mohr 2015). As leptospirosas saprófitas são ubíquas no ambiente, não sendo associadas a um hospedeiro animal e conseguem crescer a baixas temperaturas (11-13°C) (Cerqueira and Picardeau 2009).

Sendo bactérias Gram-negativas, as leptospirosas possuem uma estrutura típica de dupla membrana, associando uma membrana citoplasmática (interna) a uma parede de peptidoglicano, e ainda uma membrana externa (Yang et al. 2019). Exibem, no entanto, uma composição química única (figura 3). A membrana externa é composta principalmente por lipopolissacarídeos (LPS), mas também por uma série de lipoproteínas, designadamente lipL32, ligA, ligB, loa22 e a proteína porina ompL1. O espaço periplasmático contém o flagelo (Teodoro 2009; Valencia 2014).

Figura 3 – Comparação entre a membrana externa das bactérias Gram-negativas e das espiroquetas em particular, onde se inclui *Leptospira* (Baseado em Teodoro 2009)



A bactéria pode aderir às células endoteliais, fibroblastos, monócitos e macrófagos, componentes da matriz extracelular como o colagénio tipo I e IV, laminina, fibronectina e proteínas do sistema complemento. A virulência das estirpes relaciona-se com estas características, aliadas à capacidade de sobreviver ao ataque do sistema fagocitário e do sistema complemento. As leptospiros não patogénicas são rapidamente eliminadas da corrente sanguínea por fagocitose e ativação do sistema complemento. As leptospiros patogénicas sobrevivem, multiplicam-se e desencadeiam uma resposta imunitária específica (Valencia 2014). Ligam-se aos neutrófilos sem serem destruídas, sugerindo a presença de um elemento antifagocítico na membrana externa. Quando se inicia a resposta imunológica do hospedeiro, a bactéria tende a localizar-se em locais imunologicamente protegidos, como os TCR proximais, o trato genital e o olho (Constable et al. 2017).

O perfil de proteínas da membrana externa de *Leptospira* é relativamente complexo, incluindo lipoproteínas, LPS, peptidoglicanos e endotoxinas que constituem antigénios e que podem ser responsáveis pela disfunção tubular e inflamação. A diversidade dos sorovares resulta da heterogeneidade estrutural dos carboidratos do LPS da membrana da bactéria (Greenwood et al. 2012). Enquanto que os LPS variam entre os diversos sorovares, as proteínas da membrana externa são conservadas e possuem funções ligadas à adesão e colonização (Lafetá 2010; Valencia 2014; Yang et al. 2019). A identificação de proteínas localizadas na superfície externa de *Leptospira* é de grande importância. Serão possivelmente estas proteínas que estão envolvidas na interação das bactérias com o hospedeiro, podendo ser potenciais alvos do sistema imunitário (Fraga 2009).

LipL32 é um antigénio de superfície existente apenas entre espécies patogénicas de *Leptospira* e é expresso em grandes quantidades, tanto *in vivo* como *in vitro* (Teodoro 2009). É a proteína mais abundante nas espécies patogénicas de *Leptospira*, com uma massa molecular de aproximadamente 32 kDa (Haake et al. 2000). Está implicada em complexas interações entre fatores celulares e extracelulares. Potencia a hemólise mediada pela esfingomielinase H e é reconhecida por anticorpos IgM e IgG na fase aguda da infeção, bem como na fase de resposta humoral (Fraga 2009).

2.3.4. Fisiopatologia

O contacto com as mucosas ou soluções de continuidade na pele ou abrasões permite a penetração de *Leptospira* nos vasos sanguíneos do tecido conjuntivo subcutâneo, que dá acesso aos capilares ou vénulas pós-capilares. A ingestão pode também ser uma porta de entrada, no caso de consumo de água contaminada. A partir daqui, há uma disseminação sistémica de *Leptospira*, atingindo todos os órgãos, mas principalmente o fígado e o rim (Valencia 2014; Zachary 2017).

No rim, pela via basolateral, *Leptospira* atinge os glomérulos e capilares peritubulares, penetra na parede vascular, atinge o interstício e por fim os TCR. Pode também atingir os TCR por via apical, através dos capilares glomerulares, transitando para o espaço urinário, pelo filtrado glomerular. Estas duas vias conferem à Leptospirose características de doença túbulo-intersticial (Zachary 2017).

A localização pós-septicêmica de *Leptospira* nos rins está associada a nefrite intersticial focal ou difusa e lesão tubular transitória aguda (Cianciolo and Mohr 2015). A lise das células dos túbulos contornados proximais é multifatorial, envolvendo vasculite, isquemia, lesão pelos movimentos penetrantes de *Leptospira*, pelas suas toxinas e enzimas e ainda por mediadores inflamatórios. Os fatores bacterianos como hemolisinas, esfingomielinase, fosfolipase e hemaglutininas, presentes na parede celular potencializam estes processos. Macroscopicamente observam-se focos brancos discretos, lineares e radiais, correspondentes à necrose tubular cortical e inflamação aguda, combinados com hemorragias (Zachary 2017). Na evolução da doença ocorrem alterações hemodinâmicas, entre as quais diminuição do fluxo sanguíneo renal e diminuição da TFG. O padrão envolve diminuição da resistência vascular periférica com aumento da participação do coração. A hemólise é o resultado não só da ação das hemolisinas bacterianas, mas também da destruição imunomediada de eritrócitos. A invasão direta vai causar edema intersticial e infiltração mononuclear. As alterações do epitélio tubular variam desde tumefação, necrose e descamação, podendo formar cilindros no lúmen tubular. O padrão regenerativo do epitélio tubular em algumas áreas da inflamação é atípico, podendo produzir células gigantes (Cianciolo and Mohr 2015; Yang et al. 2019). A necrose das células dos túbulos contornados proximais implica a libertação de bactérias para o lúmen dos referidos túbulos. Assim, as leptospirosas atingem as células da ansa de Henle e, por fim, o meio ambiente através da urina. A Leptospirose renal é responsável por infiltrados multifocais e coalescentes que se estendem desde a junção corticomedular até à superfície capsular. Aparecem inicialmente neutrófilos, mais tarde linfócitos e células plasmáticas. Os casos crónicos são acompanhados de fibrose mais ou menos extensa e cicatrizes subcapsulares (Zachary 2017)

A proteína lipL32 tem ação direta nas células dos túbulos contornados proximais, aumentando substancialmente a expressão de citocinas pró-inflamatórias, entre as quais o fator de necrose tumoral “TNF- α ”, fator que pode ser decisivo na doença renal. A indução da libertação de “TNF- α ” dos monócitos ajuda a explicar o dano causado às células endoteliais, com a resultante hemorragia. A proteína da membrana externa de *Leptospira* pode também induzir a fibrose (Constable et al. 2017; Yang et al. 2019).

A mobilidade destas espiroquetas constitui um fator de virulência importante, que lhes permite penetrar na parede vascular, através das células ou pelas junções laterais

intercelulares, com o objetivo de atingir a circulação sanguínea (Valencia 2014; Zachary 2017).

2.3.5. Mecanismos imunológicos

O período de incubação da Leptospirose situa-se normalmente entre os 7 e os 12 dias, mas pode ir dos 3 aos 30 dias (Ferreira 2015). A infecção por *Leptospira* apresenta-se com duas fases distintas: a fase aguda e a fase imune ou convalescente. A fase aguda, de leptospirémia, pode começar 1 ou 2 dias após a infecção, sendo possível detetar a bactéria no sangue, na maioria dos órgãos e no líquido cefaloraquidiano durante aproximadamente uma semana. Segue-se uma fase imune ou convalescente, caracterizada pela produção de anticorpos e excreção de leptospiras na urina. À medida que o hospedeiro vai produzindo anticorpos específicos, as leptospiras vão desaparecendo da circulação sanguínea e dos tecidos (Valencia 2014; Ferreira 2015; Cianciolo et Mohr 2015; Yang et al. 2019).

2.3.6. Leptospirose em animais

Em animais a Leptospirose é ubíqua. Existem algumas diferenças em relação ao quadro clínico que ocorre nos animais e nos humanos. Além de causar doença aguda (septicémia, hepatite, nefrite e meningite), é causa de abortos e nados mortos em animais de produção. Normalmente a infecção transmite-se de forma cíclica: os animais portadores infetam as suas crias e contaminam o solo, contribuindo para a infecção de outros animais nesse ecossistema. A infecção dos fetos ocorre por via transplacentária durante o período muito limitado de leptospirémia materna, ou por diminuição da imunidade uterina aquando da presença de leptospiras no trato genital. A infecção aguda pode-se manifestar com disfunções de vários órgãos, e a tríade mais comum é febre, anemia, icterícia e insuficiência renal aguda. Observa-se principalmente em animais jovens, associado a infeções acidentais, geralmente em infeções com estirpes produtoras de hemolisina, como as do sorogrupo Pomona ou Icterohaemorrhagiae. Se sobreviverem à infecção aguda, desenvolve-se fibrose intersticial e atrofia tubular. No fígado *Leptospira* causa lesões hepáticas de necrose, que se manifestam por focos brancos ou cinzentos, disseminados aleatoriamente pelo parênquima hepático e associados a hemorragia. As lesões macroscópicas resultantes da presença de *Leptospira* na corrente sanguínea são vasculite aguda por necrose das células endoteliais, petéquias e equimoses nas superfícies serosas e região subcutânea (Cianciolo and Mohr 2015; Zachary 2017; Yang et al. 2019).

A Leptospirose bovina ocorre como resultado de infecção por uma grande variedade de sorovares. O sorovar de maior importância em bovinos na Europa é o sorovar Hardjo, sendo os bovinos o seu único hospedeiro de manutenção e encaixando-se em duas

espécies: a mais frequente, *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo (hardjo-bovis) e uma que aparece em menor escala, *L. interrogans* sorovar Hardjo (hardjo-prajitno). Este último é o mais virulento e o maior responsável pelos abortos. Na América do Norte, América do Sul, Austrália e Nova Zelândia tem também importância *L. borgpetersenii* sorovar Pomona tipo kennewicki. Existem, no entanto, evidências de infecção por outros sorovares como Canicola, Gruppotyphosa e Icterohaemorrhagiae, entre outros (Cianciolo and Mohr 2015; Zachary 2017; Ellis 2015).

Torna-se importante compreender que esta doença se manifesta de duas formas diferentes: a Leptospirose adaptada ao hospedeiro e a não adaptada ao hospedeiro. Os “hospedeiros de manutenção” ou “reservatório” são os animais infetados com estirpes de *Leptospira* adaptadas a esse organismo. Nestes animais a doença apresenta características particulares, descritas na tabela 1. Quando os animais se infetam por espécies de *Leptospira* não adaptadas a esse hospedeiro, a infecção designa-se acidental. Cada espécie de *Leptospira* é adaptada a um ou vários hospedeiros de manutenção particulares, comportando-se de forma diferente nos respetivos hospedeiros acidentais. A tabela seguinte descreve e compara alguns aspetos fisiopatológicos da infecção nos dois tipos de hospedeiro (Constable et al. 2017). Os ratos são hospedeiros bem adaptados a vários sorovares, entre os quais Icterohaemorrhagiae e Copenhageni (Lafetá 2010).

Tabela 1 – Comparação das características da infecção por *Leptospira* no hospedeiro de manutenção e no hospedeiro acidental (baseado em Constable et al. 2017)

Hospedeiro de manutenção	Hospedeiro acidental
Alta suscetibilidade à infecção	Suscetibilidade relativamente baixa à infecção
Patogenicidade relativamente baixa para o respetivo hospedeiro	Alta patogenicidade para o hospedeiro
Transmissão endémica dentro da espécie hospedeira por meio do contato direto	Transmissão esporádica dentro da espécie hospedeira; infecção de outras espécies por vezes de forma epidémica
Tendência para causar doença crónica, produzindo perdas económicas insidiosas (alterações reprodutivas)	Tendência para causar doença aguda grave
Persistência do agente no rim e por vezes no trato genital, com excreção crónica através da urina, que aumenta com a idade do hospedeiro	Fase renal curta
Baixa resposta dos anticorpos à infecção, com dificuldade de diagnóstico.	Resposta acentuada de anticorpos à infecção, facilitando o diagnóstico
Exemplos: sorovar Bratislava em suínos; sorovar Hardjo-bovis em bovinos	Exemplo: sorovar Pomona (kennewicki) em bovinos

2.3.7. Diagnóstico em animais

Perante as dificuldades em reconhecer casos clínicos de Leptospirose, devido à frequência de quadros pouco graves ou assintomáticos, o diagnóstico de Leptospirose é feito com base em procedimentos laboratoriais. Os métodos de diagnóstico da Leptospirose dividem-se em métodos de demonstração da presença do microrganismo e pesquisa de anticorpos. Incluem cultura ou deteção de *Leptospira* ou do seu ADN no sangue e fluidos corporais, e quantificação do título de anticorpos no sangue, urina, líquido cefalorraquidiano ou no muco cervical (Ellis 2015; Constable et al. 2017)

2.3.7.1. Métodos sorológicos

O Teste de Aglutinação Microscópica (TAM) é o método de eleição para o diagnóstico sorológico da Leptospirose, o teste de referência recomendado pela Organização Mundial da Saúde. Este teste consiste em incubar as diferentes diluições do soro com suspensões de diferentes sorovares de *Leptospira*. Faz-se reagir o soro suspeito com uma suspensão de leptospirosas vivas. Em casos positivos observa-se, ao microscópio em campo escuro, a aglutinação dos complexos antigénio-anticorpo. O título de anticorpos é determinado pelo inverso da maior diluição de soro no qual ocorreu 50% de aglutinação (Valencia 2014; Pinna 2018).

O Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) é um teste rápido para pesquisa de anticorpos IgM na fase aguda de infeção (Teodoro 2009). As preparações de antigénios para detetar anticorpos anti-*Leptospira* através do ELISA consistem em células inteiras ou preparações de proteínas de membrana externa (PME) e, mais recentemente, PME recombinantes (Ellis 2015). Estes últimos reagem com anticorpos dirigidos a espécies patogénicas de *Leptospira*, sendo úteis para reconhecer a doença clínica, mas com pouco interesse em estudos epidemiológicos, ou estudos retrospectivos da doença crónica, onde o intuito será reconhecer o sorovar infetante para a produção de vacinas. Em contraste, quando se utilizam antigénios a partir de LPS, o teste será específico para determinado sorogrupo. Um exemplo prático são os testes ELISA desenvolvidos para detetar anticorpos para o sorovar Hardjo no leite de tanque, detetando rebanhos infetados que não tenham sido vacinados (Ellis 2015). O ELISA tem algumas vantagens sobre o TAM: é relativamente sensível, é específico e semiautomático, usa antigénios mortos e os resultados podem ser lidos objetivamente. É relativamente mais simples, tendo maior valor como teste de rastreio sorológico (Sakhae et al. 2010). Em infeções crónicas, o teste ELISA tem sensibilidades muito baixas (Ellis 2015).

2.3.7.2. Pesquisa de *Leptospira*

Esta pesquisa pode ser feita nomeadamente através de visualização direta em microscopia de campo escuro, cultura bacteriana ou métodos moleculares de deteção de ADN (Ellis 2015). Considera-se o diagnóstico definitivo se for demonstrada infeção generalizada por *Leptospira* em vários órgãos em exame *post mortem*. De igual forma, a combinação de um quadro clínico sugestivo de Leptospirose com a demonstração do agente no sangue ou no leite confirma a doença (Ellis 2015).

A cultura e isolamento é um processo longo e que exige alguns recursos. O sorovar *Icterohaemorrhagiae* cresce e desenvolve-se em menos de duas semanas. O isolamento de estirpes mais fastidiosas pode demorar até 6 meses e podem exigir suplementação do meio (Ellis 2015). Não pode ser usado como guia terapêutico, mas fornece informação retrospectiva, podendo contribuir para estudos epidemiológicos, e para que se tomem medidas de controlo nos locais onde os casos foram detetados. Durante a incubação, as culturas devem ser examinadas a cada 7 a 10 dias em microscopia de campo escuro. O número de leptospiros viáveis na amostra e o sorovar em causa determinam o tempo necessário para o isolamento (Ellis 2015).

A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR ou *Polimerase Chain Reaction*) permite um diagnóstico precoce, tem sensibilidade elevada, e não requer a presença de organismos viáveis. Consiste na amplificação enzimática de um alvo de ADN, por meio de polimerização realizada por um termociclo (Ferreira 2015). Os ensaios permitem pesquisar genes presentes em *Leptospira* spp., ou genes existentes apenas em espécies patogénicas de *Leptospira*, tais como *lilL21*, *lipL32*, *lipL41* ou *ligA* e *ligB*. Os *primers* utilizados podem ser específicos para o género *Leptospira* ou para identificar espécies patogénicas. Não é possível identificar o sorovar, mas em certos casos é possível identificar a espécie, através da análise das curvas de fusão dos produtos de amplificação ou sequenciação (Ellis 2015; Constable et al. 2017).

3. Material e métodos

3.1. Objetivos do estudo

O objetivo do estudo foi pesquisar espécies patogénicas de *Leptospira* em rins de bovino, para avaliar a possível associação entre a infeção por este agente e as lesões renais correspondentes a nefrite intersticial crónica que originam a reprovação destes órgãos durante a inspeção *post mortem*.

Pretendeu-se estudar as causas de reprovação de rins de bovino nos matadouros, observando as suas lesões e relacionando-as com as suas possíveis causas.

3.2. Colheita de amostras

A colheita de amostras de rins de bovinos abatidos para consumo humano decorreu entre os meses de março e julho de 2018 num estabelecimento de abate de ungulados domésticos da região de Lisboa e Vale do Tejo. No total foram colhidos 40 rins apresentando lesões macroscópicas correspondentes a nefrite intersticial crónica, de 40 animais com idades variando entre os 11 e os 175 meses. Durante o mesmo período, 10 rins sem lesões, pertencentes a 10 animais, foram também colhidos para serem utilizados como controlo negativo. Os rins pertenciam a bovinos provenientes de um total de 26 explorações, correspondendo a uma média de 1,9 animais por exploração. Todos os rins foram refrigerados após a colheita até ao processamento no Laboratório de Inspeção Sanitária da FMV-ULisboa, que consistiu na colheita de fragmentos das referidas lesões, utilizando pinças estéreis e lâminas de bisturi descartáveis, substituídas entre colheitas do mesmo rim e entre rins, de modo a evitar possíveis contaminações cruzadas. Cada fragmento de rim foi, posteriormente, submetido a análise histopatológica, pelo que foi conservado em formol tamponado a 10%. A amostra de cada fragmento de rim destinada à pesquisa de espécies patogénicas de *Leptospira* foi mantida à temperatura de congelação (-20°C) até à extração de ácido desoxirribonucleico (ADN).

3.3. Análise histopatológica

As amostras das lesões renais conservadas em formol tamponado a 10% foram posteriormente processadas para histopatologia de rotina, com inclusão em parafina, no Laboratório de Anatomia Patológica da FMV-ULisboa. Após processamento, os cortes de 3 micra de espessura foram corados com Hematoxilina e Eosina para diagnóstico histopatológico das lesões.

3.4. Extração de ácidos nucleicos

A extração de ADN foi realizada utilizando o kit comercial NZY Tissue gDNA Isolation Kit (NZYTech, Portugal), de acordo com as indicações fornecidas no protocolo do fabricante. Após a extração, a concentração e pureza do ADN foi conferida recorrendo a um espectrofotómetro NanoDrop™ 2000c (Thermo Scientific, EUA), sendo a amostra de ADN conservada à temperatura de -20°C até ser utilizada.

3.5. Desenho dos oligonucleótidos iniciadores e protocolo de PCR

O desenho dos oligonucleótidos iniciadores (primers) utilizados neste estudo foi realizado utilizando o software Primer3Plus, disponível online, tendo sido encomendados à STAB Vida Genomics Lab Portugal. Para detetar espécies patogénicas de *Leptospira*, o gene *lipL32* foi considerado como o alvo de amplificação e como controlo interno de amplificação o gene bovino β -actina. As sequências utilizadas foram as seguintes: *lipL32* For 5' – CGACGGTTTAGTCGATGGAA – 3'; *lipL32* Rev 5' – GCATAATCGCCGACATTCTT – 3'; β -actina For 5' – ACTTGCCGAGAAAACGAGAT – 3'; β -actina Rev 5' GTCACCTTCACCGTTCCAGT – 3', dando origem, respetivamente, a produtos de amplificação com 227 e 123 pares de bases de extensão.

Todas as amplificações foram realizadas num sistema de PCR VWR™ Doppio com um volume total de 25 μ l por reação, contendo 2.5 U de Supreme NZYTaQ 2x Green Master Mix (NZYTech, Portugal), 0,4 μ M de cada primer e 5 μ l de ADN molde da amostra a ser testada. De modo a proceder à amplificação dos ácidos nucleicos, as reações foram submetidas às seguintes condições: passo inicial de desnaturação a 95°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, hibridação a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, finalizando com uma extensão a 72°C durante 5 minutos. As reações foram executadas em duplicado utilizando em cada uma apenas um dos pares de “primers” já referidos. Em cada ensaio foram preparadas reações sem a adição de ADN molde como controlos negativos. A reprodutibilidade do método acima descrito foi testada repetindo 40% do total de amostras selecionadas de forma aleatória. Como controlo positivo de amplificação foi usado ADN extraído a partir de um isolado de *Leptospira interrogans* sorogrupo Icterohaemorrhagiae sorovar Copenhageni, gentilmente cedido pela Doutora Teresa Rocha do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV, Portugal). Foi realizada eletroforese em gel de agarose para verificar o peso molecular dos fragmentos amplificados.

3.6. Análise Estatística

A associação estatística entre a presença de ADN de espécies patogénicas de *Leptospira* e lesões de nefrite intersticial crónica foi verificada através do Teste Exato de Fisher (R-Stat versão 3.0.2). Para tal, foi considerado o nível de significância α de 0,05.

4. Resultados

Os resultados estão representados na tabela 2 e na tabela 3.

Tabela 2 – Resultados da pesquisa por PCR do gene *lipL32* de *Leptospira*

Rim/ Resultado	Positivo	Negativo	Total	P
Nefrite Intersticial	10	30	40	0,179
Normal	0	10	10	
Total	10	40	50	

Tabela 3 – Resultados da pesquisa por PCR do gene *lipL32* de *Leptospira* de acordo com o género

Sexo/ Resultado	Positivo	Negativo	Total	P
Masculino	10	28	38	0,092
Feminino	0	12	12	
Total	10	40	50	

Podemos observar que 25% dos rins com lesões de nefrite intersticial crónica revelaram-se positivos para espécies patogénicas de *Leptospira*, sendo que 100% desses animais eram do sexo masculino. Os resultados positivos ocorreram em duas das explorações testadas.

A nefrite intersticial crónica foi confirmada por histopatologia em todos os rins colhidos com apresentação macroscópica compatível com esse tipo de lesões. Ao microscópio foi possível observar infiltrados inflamatórios de células mononucleadas e fibrose intersticial (figura 4).

Figura 4 – Observação da infiltração de células mononucleadas no interstício (imagem gentilmente cedida pelo Dr. João Cota)

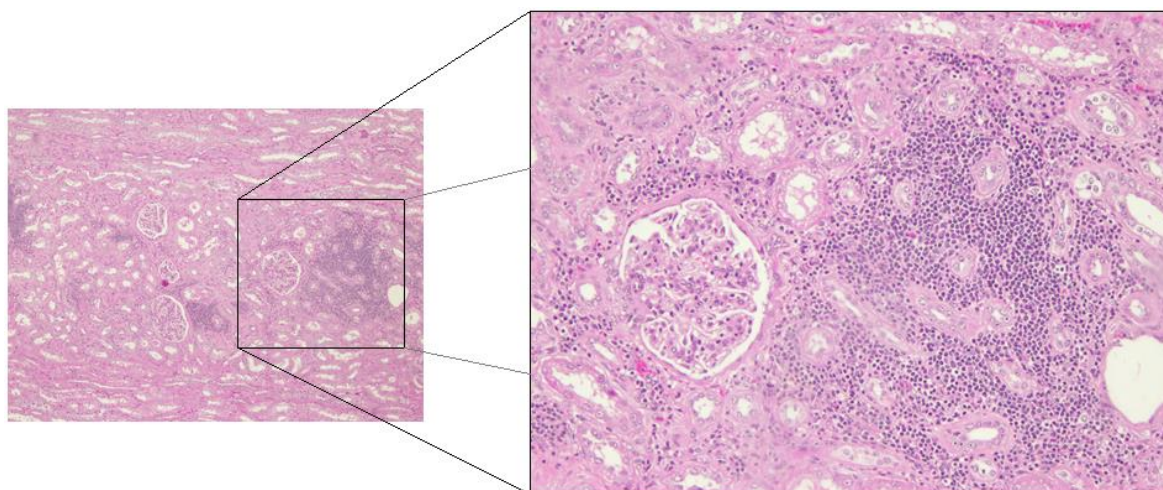


Tabela 4 – Frequência de resultados positivos e negativos de acordo com intervalos de idades

Meses	11-13	14-16	18-22	41-50	53-175	Total
Positivos	4	6	0	0	0	10
Negativos	9	21	4	3	3	40
Total	13 (26%)	27(54%)	4(8%)	3(6%)	3(6%)	50

5. Discussão

Nas últimas décadas têm sido desenvolvidos métodos laboratoriais baseados no ADN, que estão a ser amplamente aplicados no estudo de *Leptospira*. O objetivo é encontrar métodos precisos, capazes de detetar a infeção em estágios iniciais, com um pequeno número de leptospiras nas amostras, e que sejam económicos e suficientemente simples para serem utilizados com facilidade em laboratório. Os métodos moleculares asseguram a biossegurança, por não utilizar bactérias vivas em laboratório (Ferreira 2015). São mais rápidos e mais sensíveis que a cultura bacteriana, e detetam a infeção por *Leptospira* antes da produção de anticorpos (Podgoršek et al. 2020).

A Reação em Cadeia da Polimerase, sendo uma reação enzimática, é sensível a inibidores, substâncias originadas a partir da amostra ou introduzidas durante o processamento, que têm um efeito negativo na reação, e que diminuem a sensibilidade deste teste. Se estas substâncias inibirem a reação por completo, podem originar resultados falsos-negativos (Schrader et al. 2012). Por exemplo, a pesquisa de *Leptospira* por PCR em produtos do aborto pode originar problemas devidos aos inibidores que resultam da autólise dos tecidos (Ellis 2015). No presente estudo, o tempo entre a colheita dos rins e o processamento foi sempre relativamente curto, e os rins foram colocados em refrigeração (4°C) imediatamente após a colheita. O material biológico estava por isso em boas condições, não sendo espectável que existissem inibidores resultantes da autólise dos tecidos capazes de alterar significativamente os resultados. A ureia pode degradar a Polimerase, mas a sua ação é apenas crítica quando presente em concentrações significativas (Schrader et al. 2012). A sua influência como inibidor poderia eventualmente ser posta em causa se a análise fosse feita a partir de urina. O controlo interno feito pela amplificação do gene β -actina de bovino torna pouco provável que tenha ocorrido inibição da reação de PCR ou problemas na extração de ADN.

A detecção de ADN de *Leptospira* através de PCR a partir da urina é considerada altamente sensível e específica para identificar bovinos cronicamente infectados e a excretar o agente. Permite detetar animais positivos com resultados sorológicos negativos (Ellis 2015; Constable et al. 2017). Pode ser uma boa escolha em animais vivos para detetar infeção subclínica. A excreção intermitente de *Leptospira* na urina é comum, e como tal a falha em demonstrar a presença de *Leptospira* numa amostra de urina não exclui a possibilidade de infeção crónica. Em bovinos, a leptospinúria pode persistir por um período entre 10 a 118 dias, com níveis máximos de excreção na primeira metade deste período. *Leptospira* pode persistir no rim por períodos muito maiores do que aqueles em que é possível demonstrar a espiroqueta na urina (Constable et al. 2017). O epitélio dos TCR é o local ideal para a multiplicação e disseminação das leptospiras. É uma zona rica em nutrientes provenientes do filtrado glomerular e facilita a disseminação das bactérias para o exterior, através da urina (Valencia 2014). Por último, o pH e a osmolaridade intracelular nos TCR permitem a sobrevivência de *Leptospira* (Yang et al. 2019). Assim, a pesquisa de *Leptospira* a partir do rim, um órgão privilegiado para a persistência de *Leptospira* em animais, é uma escolha adequada para estudos realizados em animais abatidos. Além disso, a colheita da amostra terá menores probabilidades de contaminação se for feita a partir do rim.

Os métodos moleculares para detecção de *Leptospira*, incluindo o PCR, fornecem resultados precoces e precisos (Yang et al. 2019). Dadas as características deste teste (elevada sensibilidade e especificidade), a aplicação de boas práticas em laboratório (que evitam a contaminação das amostras), a escolha do tipo de amostras e a utilização de um protocolo que inclui controlos internos, controlos positivos e controlos negativos, que correram como esperado, considera-se pouco provável que ocorram resultados falsos-negativos ou falsos-positivos.

A infiltração mononuclear observada nos resultados histopatológicos é indicativa de ativação das cascatas de inflamação, e pode ser um indício indireto da presença de um agente infeccioso, apesar de poder ter outras etiologias. A presença de fibrose intersticial indica que a doença já está na fase crónica.

Para detetar *Leptospira* em fluidos corporais, a microscopia de campo escuro é um método rápido, mas falta-lhe sensibilidade e especificidade. Os artefactos no sangue podem originar falsos positivos, e a natureza transitória da bacteriemia torna difícil a detecção de *Leptospira* no sangue ou no leite. Mais difícil se torna quando os animais são submetidos a antibioterapia antes da colheita das amostras. Em amostras de urina a excreção intermitente de *Leptospira* pode impedir a sua detecção. A administração de

diurético pode ajudar a resolver este problema. A presença de leptospiros no trato genital, nos rins ou na urina pode significar que o animal é apenas portador (Ellis 2015).

A imunofluorescência e a coloração imunohistoquímica são métodos apropriados nos casos em que os animais morrem, sendo a imunofluorescência direta particularmente útil no diagnóstico de infecção fetal (Ellis 2015). A presença de *Leptospira* em fetos abortados ou nados-mortos, nos seus fluidos corporais e órgãos internos como rim, fígado, pulmão, cérebro, glândula adrenal, linfonodos mesentéricos ou conteúdo gástrico, é interpretada como diagnóstico de Leptospirose ativa no feto e Leptospirose crônica na mãe. Se a infecção for apenas no tecido placentário, não se considera evidência de infecção fetal (Ellis 2015).

5.1. Pesquisa do gene *lipL32*

No presente estudo, a detecção, por PCR, do gene *lipL32* (que codifica a proteína lipL32) em 25% dos animais com lesões de nefrite intersticial crônica, sugere a possibilidade de a bactéria ter estado presente, em algum momento, nestes bovinos. Detetou-se a presença de um gene de *Leptospira*, que pode estar presente sem que a bactéria esteja viva ou sequer íntegra na sua estrutura morfológica. A incapacidade do PCR de diferenciar ADN de células bacterianas viáveis ou mortas prejudica a estimativa do risco epidemiológico (Ferreira 2015). Embora um teste PCR positivo identifique a presença de *Leptospira* (Ellis 2015), este não permite confirmar a sua viabilidade no momento da colheita.

Uzal et al. (2002) tentaram estabelecer uma relação entre *Leptospira* e rins com lesões de nefrite intersticial crônica. Para isso, em contraste com o teste PCR realizado no presente trabalho, Uzal et al. (2002) recorreram ao TAM e à Técnica de cultura e isolamento da bactéria, obtendo resultados, na sua maioria, negativos. A identificação de animais cronicamente infetados por *Leptospira* através de testes sorológicos ou cultura bacteriana é difícil, tal como a correspondente confirmação de Leptospirose como sendo a causa direta de perdas reprodutivas em animais de produção (Constable et al. 2017). A recuperação da fase aguda da doença coincide com o fim da septicémia e aparecimento de anticorpos circulantes, normalmente entre a primeira e a segunda semanas de infecção (Ellis 2015). Nos referidos estudos, caso a bactéria tenha sido responsável pelas lesões em causa, esta não estaria viável ou passível de se cultivar na maioria dos casos, e os anticorpos não estariam em títulos detetáveis (Uzal et al. 2002). A cultura e isolamento tem 100% de especificidade, mas sensibilidade muito baixa, devido, por exemplo, à possível contaminação com outros microrganismos, e ao tempo entre a colheita e o processamento

das amostras. Os requisitos de isolamento, as técnicas de cultivo e a interpretação dos resultados são, por vezes, enormes desafios em laboratório. Os métodos de pesquisa do micorganismo são adequados nas seguintes situações: na fase de bacteriemia inicial da infecção (pesquisa no sangue ou leite); em casos fatais, fetos abortados ou nados mortos, em que pode existir infecção em vários órgãos; na fase de convalescença, em que *Leptospira* se localiza nos locais imunologicamente protegidos, mas podendo ser detetada na urina, produtos do aborto ou no humor aquoso (Ellis 2015).

O Teste de Aglutinação Microscópica é também um teste de alta complexidade, pois implica preservar uma grande coleção de estirpes de *Leptospira*, obriga ao manuseamento de estirpes viáveis em laboratório, o que acarreta perigo biológico, e é um teste moroso e restrito a laboratórios de referência internacional. A sua sensibilidade aumenta em animais em convalescença, cujos títulos de anticorpos no soro são elevados, mas a colheita de amostras nesta fase é difícil, impedindo por vezes a confirmação dos casos (Ellis 2015; Constable et al. 2017; Yang et al. 2019). O TAM é o método mais frequentemente utilizado para determinar a prevalência em rebanhos. Não permite, no entanto, a deteção da doença em fases muito precoces, uma vez que só é possível encontrar anticorpos específicos 5 ou 7 dias após o aparecimento dos primeiros sinais clínicos. O TAM apresenta assim algumas dificuldades que o tornam pouco prático como método de diagnóstico de rotina da Leptospirose. A sua complexidade justificou o desenvolvimento de outros testes (Teodoro 2009).

Uzal et al. (2002) conseguiram isolar *Leptospira borgpeterseni* sorovar Hardjo a partir de urina de uma vaca e a partir de urina e rins de outra vaca, ambas com lesões de nefrite intersticial crónica. Embora os dois casos representem uma ínfima parte da amostra total (118 bovinos com as referidas lesões), estes resultados evidenciam que existe pelo menos a hipótese de em alguns animais com aquelas lesões, o agente infeccioso permanecer viável, com possibilidade de causar doença, e com a agravante de estar possivelmente a ser excretado na urina.

Os resultados estatísticos do presente estudo são inconclusivos quanto a uma possível relação entre lesões de nefrite intersticial crónica e a possibilidade de infecção por *Leptospira*. No entanto, perante a existência de resultados positivos, e dadas as características clínicas desta doença, será razoável pensar que pelo menos uma parte das lesões de nefrite intersticial crónica encontradas durante o exame *post mortem* possam corresponder a casos crónicos de Leptospirose.

5.2. Frequência de *Leptospira* como causa de nefrite intersticial crónica

Embora os “rins com manchas brancas” (WSK) sejam muitas vezes associados empiricamente a uma consequência de infeção prévia por *Leptospira*, a informação científica sobre essa relação é limitada. Estas lesões podem representar uma seqüela de bacteriemia de uma grande variedade de agentes infecciosos, tais como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. ou *Brucella* spp e não devem ser considerados patognomónicos de Leptospirose (Uzal et al. 2002; Constable et al. 2017). No presente trabalho, as lesões testadas para PCR que revelaram resultados negativos podem ter resultado da influência de outros agentes infecciosos que não *Leptospira*. Além disso, não se exclui a possibilidade de ter existido infeção prévia por *Leptospira*, sem que o gene pesquisado estivesse presente, concretamente, nas lesões submetidas a análise.

Azizi et. al. (2012) realizaram, na região do sudoeste do Irão, uma pesquisa do gene *lipL32* por PCR em 24 rins de bovino com manchas brancas e referem que os seus resultados indicam que estas lesões se relacionam com a presença de *Leptospira*. Segundo Taghadosi et al. (2016), estudos feitos em Shiraz (Irão) referem que a associação estatística entre WSK e a infeção por espécies patogénicas de *Leptospira* em bovinos era elevada. Nally et al. (2018), nos EUA, reconheceram que os bovinos constituem perigo zoonótico como hospedeiro reservatório. Nesse estudo foram feitas colheitas de urina diretamente da bexiga de animais enviados para o matadouro, tendo sido reconhecida a excreção ativa de *Leptospira*. Também os estudos de Taghadosi et al. (2016) concluíram que existe risco de transmissão a humanos, particularmente elevado para os trabalhadores de matadouros, veterinários e agricultores.

Alguns autores relativizam a importância dos WSK, uma vez que normalmente aparecem como achados acidentais em inspeção sanitária (Uzal et al. 2002), sem sinais sugestivos de doença infecciosa ativa nos animais. De qualquer forma, além do aspeto repugnante e da alteração de consistência que impedem estes rins de serem aprovados para consumo humano, a possibilidade da presença de agentes infecciosos implica sempre que os rins com este tipo de lesões sejam reprovados (Uzal et al. 2002). No presente estudo, os resultados apresentados na tabela 2 não permitem estabelecer uma relação entre a presença de lesões renais de nefrite intersticial crónica e a presença de ADN de *Leptospira*, uma vez que não existe nenhuma associação estatisticamente significativa.

5.3. Leptospirose em bovinos

Na tabela 3, verificamos que o valor P (0,092) é superior ao valor α considerado. Como tal, não é possível dizer, a partir destes dados, se a Leptospirose em bovinos é ou não mais frequente em machos. A análise foi estatisticamente não significativa, mas note-se que apenas 12 dos 50 animais testados (6%) eram fêmeas.

O impacto económico da Leptospirose em bovinos é causado maioritariamente devido a problemas reprodutivos. A maioria das infeções por *Leptospira* em explorações de bovinos estão associadas a abortos, nados mortos, nascimento de bezerros fracos e diminuição da produção de leite (Constable et al. 2017). As manifestações graves, como hemoglobinúria, febre, anemia, icterícia e dispneia devido à congestão pulmonar ocorrem em bezerros infetados com sorovares acidentais, especialmente o sorovar Pomona. Pode observar-se edema do pulmão e hepatomegália com zonas de necrose em redor das veias. Em vacas, os problemas na produção de leite estão associados essencialmente ao sorovar Hardjo (hardjo-prajitno), mas podem resultar de infeção por qualquer sorovar. Pode ocorrer agaláxia ou libertação de pequenas quantidades de leite com consistência de colostro, coágulos espessos e coloração amarelada. Há uma quebra na produção leiteira e pirexia transitória. O úbere fica flácido e mole, sendo todos os quartos afetados. O aborto pode ocorrer durante a fase aguda ou durante a convalescença, várias semanas depois, ou mesmo sem doença clínica prévia. A forma crónica da doença em vacas grávidas, associada aos sorovares Hardjo e Pomona, origina abortos, nados-mortos ou nascimento de bezerros prematuros e fracos. Os bovinos em fase terminal apresentam nefrite intersticial multifocal (Cianciolo and Mohr 2015; Constable et al. 2017). As vacas reprodutoras desempenham, por isso, um papel fundamental nas perdas económicas resultantes da Leptospirose em explorações de bovinos.

Taghadosi et al. (2016) observaram uma relação direta entre o aumento da idade e o aumento significativo de diferentes lesões renais. A observação da tabela 5 indica-nos que a maioria dos animais testados tinham entre 14 e 16 meses (54%). Ainda assim, não houve animais positivos com mais de 16 meses.

5.4. Importância do Diagnóstico

O diagnóstico de Leptospirose pode ser pertinente por várias razões, não só para confirmar a doença clínica, mas também para avaliar o estado imunológico de um rebanho no âmbito de programas de controlo ou erradicação da doença, ou ainda para avaliação do estatuto imunológico individual de animais que serão comercializados ou introduzidos em

rebanhos indemnes. Tendo em conta os quadros possíveis da doença, é necessário diferenciar a Leptospirose de outras situações, nomeadamente quando ocorrem quebras repentinas de produção leiteira ou doenças que causem insuficiência hepática, insuficiência renal, abortos, nados-mortos, bezerros fracos ou infertilidade (Ellis 2015). O diagnóstico diferencial da doença aguda em bovinos inclui doenças que causem anemia hemolítica, com ou sem hemoglobinúria, entre as quais Babesiose, Anaplasmosse ou Hemoglobinúria Bacilar. Em caso de aborto, as suas causas devem ser distinguidas, sendo as mais frequentes a Rinotraqueíte Infeciosa Bovina, Toxoplasmose, Neosporose, Micoplasmose, Diarreia Viral Bovina ou Brucelose. Há que ter em conta os programas de vacinação em vigor na exploração e os dados epidemiológicos da área geográfica em causa. Na presença de quebras repentinas da produção leiteira devemos considerar doenças respiratórias e mudanças de manejo ou de alimentação (Constable et al. 2017).

O diagnóstico laboratorial da Leptospirose pode ser realizado numa fase precoce por PCR. Os testes sorológicos, mais económicos que os métodos moleculares, como o ELISA-IgM e o TAM, possuem baixa sensibilidade na fase inicial da doença, uma vez que os títulos de anticorpos podem ser indetetáveis ou muito baixos. Estes e outros problemas técnicos laboratoriais e a frequência de quadros clínicos pouco graves e inespecíficos justificam que a Leptospirose seja uma doença subdiagnosticada. O baixo número de casos diagnosticados, por sua vez, diminui a probabilidade desta doença ser considerada em diagnósticos diferenciais por parte dos clínicos, o que nos deixa num círculo vicioso que impede uma avaliação precisa do estatuto sanitário desta doença em Portugal (Medeiros 2019).

A identificação do sorovar de *Leptospira* pode ser útil para determinar a importância clínica do caso, a provável fonte de infeção, para distinguir casos esporádicos de possíveis surtos e também para avaliações epidemiológicas. Uma vantagem do TAM é a sua especificidade para o sorogrupo e sorovar, em comparação com outros testes (Who 2003). O teste de absorção de aglutinação cruzada identifica as estirpes ao nível do sorovar, mas é um teste muito moroso e apenas possível em alguns laboratórios, não sendo rotineiramente utilizado (Cianciolo and Mohr 2017).

A deteção de anticorpos numa amostra não é prova de infeção ativa, uma vez que os anticorpos podem persistir por longos períodos após a infeção. A soroconversão, baseada na identificação de títulos de anticorpos consecutivamente maiores ao longo de várias análises separadas no tempo, é considerada diagnóstico de infeção ativa (WHO 2003).

Num estudo realizado na Tanzania (Mgode et al. 2015) em amostras de urina de várias espécies animais, verificou-se, através do TAM, entre outras associações entre sorovar e hospedeiro, as seguintes: Sokoine em bovinos e roedores; Mwogolo e Lora em

roedores e Kenya em roedores e musaranhos. Os sorovares mais frequentes na região são o sorovar Sokoine e o Kenya, presentes em diversos vertebrados, incluindo peixes e humanos. Trabalhos como estes permitem melhorar os estudos de prevalência de Leptospirose, devido à inclusão dos sorovares referidos no painel de antígenos do TAM.

Estão atualmente a ser exploradas diversas técnicas moleculares. Contudo, estas técnicas requerem equipamentos especiais caros e procedimentos laboriosos e requerem a presença de grandes quantidades de ADN de alta qualidade (Ferreira 2015).

A especiação seria importante para identificar melhor a provável fonte de infeção e para distinguir casos esporádicos de possíveis surtos (Ferreira 2015). A eletroforese em gel de campo pulsado revelou padrões coincidentes com os sorovares. Existem estudos baseados em ensaios de RT-PCR capazes de detetar e identificar algumas espécies de *Leptospira* em tecidos. Algumas variações dos métodos moleculares permitem obter padrões de bandas com o objetivo de discriminar as espécies. A técnica RT-PCR é mais rápida, mais simples e menos sujeita a contaminação (Greenwood et al. 2012, Podgoršek et al. 2020).

Os métodos baseados em sequências, tais como a técnica “Multi-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis” (MLVA) e “Multi-Locus Sequence Typing” (MLST), podem produzir informações significativas em relação a um sorovar. A técnica de MLVA baseia-se na deteção de diferenças no número de cópias de sequências de ADN repetidas em tandem, fornecendo informações quanto à diversidade evolutiva de *Leptospira* e adequando-se ao estudo de surtos regionais. Na abordagem MLST, vários genes de manutenção de um isolado são amplificados e sequenciados em ambas as cadeias. Estes métodos, embora exigindo pessoal qualificado e equipamentos caros, são reproduzíveis e distinguem com eficiência os sorovares. Os dados resultantes destas técnicas podem ser partilhados pela comunidade científica e são adequados para biocomputação e análise estatística. Futuramente é previsível que se padronizem os esquemas de genotipagem e que se chegue à identificação de sorovares por sequenciação integral do seu genoma (Ferreira 2015).

5.5. Prevalência de *Leptospira*

Nas regiões temperadas *Leptospira* tem uma incidência sazonal, coincidindo com os maiores períodos de chuvas. A incidência na Europa e nos países desenvolvidos em geral está predominantemente relacionada com questões ocupacionais e de exposição recreacional. Nestas zonas a doença surge associada a atividades aquáticas de lazer ou a certas profissões de risco (veterinários, agricultores, mineiros, trabalhadores de

saneamento, de pecuária, de matadouro, militares) que implicam um maior contacto, direto ou indireto, com a água, solo e/ou produtos contaminados pela urina dos animais infetados (Greenwood 2012; Medeiros 2019; Yang et al. 2019).

A humidade dos solos é o fator mais importante para a persistência do microrganismo (Constable et al. 2017). Os solos e zonas com águas superficiais albergam uma grande diversidade de espécies não patogénicas de *Leptospira*, e outras cuja virulência ainda não está claramente estabelecida (Vincent et al. 2019). A resistência desta bactéria no ambiente e a facilidade de disseminação, em grande parte através dos roedores, contribuem para que o controlo da Leptospirose se revele um grande desafio (Greenwood et al. 2012; Medeiros 2019).

Em Portugal, Delgado (2020) recolheu, nos distritos de Lisboa e Setúbal, amostras de água (lagos, rios, fontes públicas e bebedouros), solo e amostras biológicas (sangue, urina, fígado, rim, pulmão, baço) de roedores capturados nas proximidades dos locais de colheita das amostras ambientais. Foi amplificado ADN de espécies patogénicas de *Leptospira* em 35% das amostras de água, 9% das amostras dos solos e em 79% das amostras dos roedores. Os resultados da sequenciação revelaram a prevalência de duas espécies patogénicas: *Leptospira interrogans* e *L.borgpetersenii*.

Segundo os dados obtidos por Moreira (2012), existe alguma relação entre a notificação de casos de Leptospirose humana com os meses de maior pluviosidade, nomeadamente janeiro, fevereiro e março. No entanto, é importante referir que não existem informações publicadas relativamente à maior probabilidade de bovinos estarem infetados por *Leptospira*, sendo que não é possível estabelecer uma possível associação com períodos de maior pluviosidade.

5.6. Situação em Portugal

Em Portugal a Leptospirose está incluída na lista de doenças de declaração obrigatória em humanos (Despacho n.º 12513-B/2019). O centro de Portugal Continental e o arquipélago dos Açores são as zonas mais afetadas (Moreira 2012). Nos Açores têm sido implementados programas de prevenção, controlo e vigilância, principalmente nas ilhas mais povoadas, São Miguel e Terceira (IHMT-UNL). Entre 1996 e 2010 foram notificados 734 casos de Leptospirose humana em Portugal. A maioria dos casos ocorreram nos meses de maior pluviosidade do país (Moreira 2012). Segundo o Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças, em 2018 foram reportados 802 casos de Leptospirose em humanos na Europa, dos quais 69 foram em Portugal, tendo ocorrido 2 mortes no país. Segundo Ferreira (2015), os sorogrupos mais predominantes são Icterohaemorrhagiae e Ballum,

sendo o sorogrupo Pomona reportado apenas na zona continental do país. A estirpe *L. kirschneri* sorovar Mozdok tipo 2 só foi isolada em Portugal.

Lima (2008) reconheceu, em soros de vacas não vacinadas, na ilha de São Miguel (Açores), através do TAM, os sorogrupos Sejroe e Icterohaemorrhagiae como dois dos mais frequentes na região. Silva (2017) verificou que o sorovar Hardjo estava presente no efetivo bovino de aptidão leiteira em 75% das explorações da ilha Terceira, recorrendo à técnica de ELISA indireto, com amostras colhidas no tanque de leite. Estes estudos permitem aumentar a consciencialização dos produtores e dos Médicos Veterinários que trabalham com as explorações.

Os testes sorológicos efetuados em 208 bovinos num estudo realizado no Brasil (Pinna et al. 2018) mostraram que 37% dos animais tinham anticorpos anti-*Leptospira*, sendo o mais comum o sorogrupo Sejroe, e 63,9% eram positivos pela técnica de PCR.

Neste estudo, as explorações com animais positivos representam menos de 8% do total de explorações testadas. O facto destas explorações estarem localizadas na mesma região, remete-nos para a hipótese de existirem nessa determinada região condições edafoclimáticas mais propícias à manutenção de *Leptospira* no ambiente e consequentemente nas explorações de bovinos, embora essas características não tenham sido contempladas no presente estudo.

5.7. Causas mais frequentes da reprovação de rins de bovino

Nourmohammadzadeh et al. (2010) fizeram um estudo da prevalência de lesões renais em gado bovino no Irão, colhendo aleatoriamente amostras de 405 bovinos clinicamente saudáveis, abatidos em matadouro. Apenas 8,6% dos animais apresentavam lesões renais, sendo na sua grande maioria lesões de nefrite intersticial (85.7%). No Brasil, no estado do Acre, Israel et al. (2014) referem que 29,66% dos rins reprovados eram devido a nefrite e quistos renais, superando mesmo a reprovação de fígados (13,46%). Num estudo realizado na Argélia (Mahouz et al. 2015), foram detetadas lesões em 55 de 300 animais saudáveis (22.66%), sendo a nefrite intersticial e a glomerulonefrite as lesões mais frequentes.

Em Portugal, Teixeira (2002) verificou que as nefrites não específicas foram a maior causa de reprovação de rins no matadouro do Cachão (72%), seguido de petéquias (13%) e quistos renais (9%). A congestão, hemossiderose e amiloidose foram registadas como causas residuais de reprovação de rins.

Cabrita (2014) estudou as causas de reprovação de carcaças e vísceras de bovino num matadouro na Região de Lisboa e Vale do Tejo e verificou que a taxa de reprovação de

rins era de 7,8%, sendo a maioria devido a cálculos renais (5,49%), nefrite (1,2%) e hidronefrose (0,63%), entre outras causas.

Uma pequena parte dos rins reprovados para consumo humano estão incluídos em casos em que as carnes são totalmente reprovadas, como por exemplo na presença de pneumonia purulenta ou neurofibromatose. Há ainda a referir as reprovações de rins por conspurcação, com conteúdo fecal ou outro (Cabrita 2014).

Oliveira (2016) registou, durante a inspeção *post mortem* de um total de 796 bovinos, a reprovação de rins em que 192 apresentavam lesões de nefrite intersticial crónica, representando uma taxa de reprovação de cerca de 24%.

5.8. Controlo e prevenção

Os princípios do controlo da Leptospirose numa exploração são baseados na interrupção direta ou indireta da transmissão da infeção. A vigilância epidemiológica permite-nos compreender fatores como o número de animais infetados, os sorovares implicados, hospedeiros de manutenção e risco de transmissão. O objetivo é não só controlar a infeção numa espécie em particular, mas também reduzir o risco zoonótico. Deve ser privilegiada a vigilância em espécies animais que representam grandes perdas económicas, com um histórico conhecido de serem hospedeiros de manutenção da *Leptospira* e espécies identificadas em estudos da doença em humanos (Ellis 2015). A espécie bovina, aqui estudada, é uma delas. Os métodos de diagnóstico dependem também dos objetivos: controlar a doença clínica, imunizar uma população ou erradicar a doença.

Os métodos de controlo passam pela vacinação, antibioterapia, pesquisa do perfil imunológico de uma população, identificação e remoção de animais infetados e controlo dos roedores (Ellis 2015). O controlo com antibióticos é utilizado para eliminar portadores. A vacinação é feita com vacinas a partir de sorovares que causam a doença numa área geográfica em particular (Constable et al. 2017). As vacinas de uso veterinário são compostas por bactérias inativadas pela ação do calor ou formol (Fraga 2009).

O primeiro passo é identificar a fonte de infeção original, que podem ser animais clinicamente afetados, produtos do aborto, animais portadores, espécies selvagens existentes no ambiente e fontes contaminantes ambientais, como zonas com água (Constable et al. 2017). A probabilidade de infeção dos bovinos por *Leptospira* sorovar Hardjo aumenta pela aquisição de outros animais, pastoreio em terrenos onde existem outras espécies ou acesso a cursos de água contaminados. Os produtores com rebanhos em elevado risco de contaminação e cujo valor individual de cada animal é considerável devem vacinar todo o rebanho (Constable et al. 2017). As taxas de infeção em vacas

leiteiras em estabulação permanente são baixas, embora se possa especular que as dietas que originam um pH ácido da urina sejam um fator de redução da transmissão (Ellis 2015).

Em caso de surtos numa exploração, em que apareçam frequentemente casos de doença clínica, com deteção de títulos crescentes de anticorpos, deve-se adotar um conjunto de medidas. É necessário tratar os animais com sinais clínicos e os animais positivos, vacinar os animais negativos, e transferir o efetivo para uma zona limpa. Idealmente devem-se fazer testes numa fase posterior, para avaliar a taxa de transmissão. Se os casos forem esporádicos, é razoável tratar ou refugar os animais infetados (Constable et al. 2017).

Perante estas considerações, reconhece-se que estudos como o que aqui foi realizado contribuem para a vigilância epidemiológica, estimulando a consciencialização e a criação de programas de controlo doença.

Dadas as dificuldades técnicas no diagnóstico de Leptospirose, a vacinação, particularmente em animais, tem-se revelado uma solução atraente para reduzir o impacto desta doença (Hartwig et al. 2010). O título de anticorpos induzido pelas bacterinas é baixo para o TAM, mas produz imunidade protetora por pelo menos 12 meses (Constable et al. 2017). As vacinas incluem normalmente cinco ou seis sorovares de *Leptospira interrogans* representantes de vários sorogrupos, com o objetivo de espoletar reações cruzadas do sistema imunitário. Este princípio acarreta algumas falhas de eficácia vacinal, por ausência de algum sorovar prevalente na região e por o período de proteção da vacina nem sempre ser suficiente. A formulação de vacinas específicas para cada rebanho, após estudo dos sorovares é uma solução (Lafetá 2010).

Em ambientes endémicos, em que circulem sorogrupos semelhantes de *Leptospira* com soroprevalência elevada, seria importante implementar uma vacina atenuada para a população humana de risco. Por exemplo, na Ilha de São Miguel, *Leptospira* inativada pertencente ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae constituiria uma vacina apropriada para os trabalhadores de profissões de risco, uma vez que este é o sorogrupo infetante mais frequente (Medeiros 2019).

A vacinação em humanos está restrita a indivíduos com profissões de alto risco e quando ocorrem inundações e epidemias. Por exemplo, em Cuba, onde a Leptospirose é uma doença endémica, está disponível uma vacina humana trivalente. A vacina de *Leptospira* Icterohaemorrhagiae inativada, seria apropriada para a população de risco da Ilha de São Miguel, nos Açores, uma vez que este é o sorogrupo infetante mais frequente nesta zona endémica. A quimioprofilaxia pode ser uma solução quando a exposição a curto prazo em humanos é inevitável (Medeiros 2019).

6. Conclusão

A Leptospirose em animais de produção ganha relevância económica, principalmente devido a alterações reprodutivas. O controlo dos roedores é essencial, visto que este é o hospedeiro de manutenção mais comum, mas revela-se também de grande importância aferir o impacto que as espécies pecuárias têm na manutenção e perpetuação da doença.

A dinâmica de propagação da infeção dentro de espécies ou grupos de animais acontece de forma cíclica: um animal portador, sobrevivente de uma infeção aguda infeta outros animais, nomeadamente os seus descendentes. Os hospedeiros de manutenção, que excretam o agente durante longos períodos e dificilmente são reconhecidos como animais infetados, revelam-se essenciais na perpetuação da doença nos ecossistemas. Por outro lado, os hospedeiros acidentais têm quadros clínicos mais graves e podem originar surtos epidémicos. Reconhece-se, portanto, que as dinâmicas biológicas da Leptospirose acarretam grandes problemas na saúde pública e na saúde animal.

Os resultados positivos alertam para a existência de algum grau de risco para a saúde pública.

O risco sanitário nos matadouros pode ser minimizado principalmente pela formação e sensibilização dos trabalhadores para o cumprimento de métodos de trabalho seguros e boas práticas de higiene. Bactérias como *Staphylococcus* spp., *Proteus* spp., *Escherichia coli*, *Enterobacteriaceae* ou *Salmonella* spp., ou outros agentes ubíquos são presença comum nestes ambientes, e as medidas de prevenção permanentemente em vigor que visam impedir a contaminação ou infeção por estes agentes podem ser uma mais valia para paralelamente prevenir, também, a infeção por *Leptospira* a partir das carcaças e vísceras. A vacinação sistemática de humanos fora do contexto ocupacional não será adequada, dado o elevado grau de imprevisibilidade no contacto com diferentes sorovares.

A Leptospirose tem vindo a ganhar especial atenção na comunidade científica internacional, em parte devido ao surgimento de surtos de Leptospirose humana em países desenvolvidos. Crê-se que as alterações climáticas e a importação da doença a partir de áreas endémicas, devido ao turismo, possam ter contribuído para estas situações. A persistência de populações sem condições básicas de saneamento em países em desenvolvimento contribui também para as preocupações referentes ao aumento da prevalência de doenças infecciosas, nas quais a Leptospirose se inclui.

Existem cada vez mais estudos sobre *Leptospira* e Leptospirose. A biologia molecular veio revolucionar a classificação do Género *Leptospira*, podendo por vezes causar alguns problemas de comunicação entre cientistas na identificação das diversas

espécies e variedades de *Leptospira*. Estes serão problemas menores, que precisam de ser acertados, para que se possa entender a biologia molecular como uma ferramenta que complementa a informação fenotípica e estimula o desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico ao serviço das populações. Tanto os métodos sorológicos como os métodos moleculares têm as suas vantagens e limitações, contribuindo ambos para a comunidade científica.

A Reação em Cadeia da Polimerase é cada vez mais usada como o método padrão para detetar e caracterizar microrganismos e marcadores genéticos em vários tipos de amostras. A determinação dos sorovares é um fator importante e algumas das novas técnicas moleculares baseadas em sequência de ADN têm-se mostrado promissoras na distinção dos sorovares e no conhecimento da epidemiologia e taxonomia da *Leptospira*. Por agora, os meios de diagnóstico são complexos, mas futuramente é previsível que se padronizem os esquemas de genotipagem e se chegue à identificação de sorovares por sequenciação integral do seu genoma.

A variabilidade do quadro clínico da Leptospirose, as dificuldades do diagnóstico e a ausência de programas de vigilância epidemiológica continuada e abrangente, principalmente em países em desenvolvimento, são alguns dos fatores que dificultam a caracterização do panorama mundial da doença.

Bibliografia

- Asfaw A, Afera B . 2014. Prevalence of Hydatid Cyst in Cattle at Municipal Abattoir of Shire. *Journal of Veterinary Science and Technology*. 5(3):5. <http://dx.doi.org/10.4172/2157-7579.1000186>
- Azizi S, Tajbakhsh E, MR, Hajimirzaei MR, Varnamkhasti MG, Sadeghian H, Oryan A. 2012. Evaluation of 'white-spotted kidneys' associated with leptospirosis by polymerase chain reaction based *LipL32* gene in slaughtered cows. *Journal of the South African Veterinary Association* 83(1):E1-E5. <http://doi.org/10.4102/jsava.v83i1.69>
- Cabrita IBS. 2014. Análise das causas em ato de Inspeção Sanitária de rejeição e respetiva frequência de carcaças e vísceras de bovino no Matadouro Santacarnes S.A. (Dissertação de Mestrado). Lisboa: Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária
- Cerqueira GM, Picardeau M. 2009. A century of *Leptospira* strain typing. *Infection, Genetics and Evolution*. 9(5): 760-768. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.06.009>
- Cianciolo RF, Mohr FC. 2015. Urinary System. In: Maxie MG, editors. *Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology Of Domestic Animals*. 6th ed. Missouri: Elsevier Ltd.
- Collins DS, Huey RJ. 2015. *Gracey's Meat Hygiene*. 11th ed. West Sussex: John Wiley & Sons, Ltd.

- Constable PD, Hinchcliff KW, Done SH, Grünberg W. 2017. *Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs, and Goat*. 11th ed. St. Louis: Elsevier Ltd.
- Decreto-Lei n.º 84/1997 de 16 de abril. Diário da República n.º 89/1997 – I Série – A. Ministério para a Qualificação e o Emprego Lisboa
- Decreto-Lei n.º 193/2004 de 17 de agosto. Diário da República n.º 193/2004 – I Série – A. Ministério da Agricultura, Desenvolvimento Rural e Pescas. Lisboa
- Decreto Legislativo Regional n.º 31/2010/A Medidas de prevenção, controlo e redução da presença de roedores invasores e comensais. Região Autónoma dos Açores, Assembleia Legislativa.
- Decreto Regulamentar n.º 6/2001 de 5 de maio. Diário da República n.º 104/2001 – I Série – B. Ministério do Trabalho e da Solidariedade, Lisboa.
- Delgado FF. 2020. Detecção e identificação de bactérias do género *Leptospira* em amostras ambientais e em pequenos mamíferos, de dois distritos de Portugal, através de abordagens moleculares. (Dissertação de Mestrado). Lisboa: Unidade de Microbiologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa.
- Despacho n. 12513-B/2019 de 31 de dezembro de 2019. Doenças de notificação, clínica e laboratorial obrigatória. Diário da República n. 251 – 2^a Série – Parte C – Saúde. Pág. 331-(25) Direção-Geral da Saúde
- Dijk JE, Gruys E, Mouwen JMVM. 2007. *Color Atlas of Veterinary Pathology*. 2nd ed. Philadelphia (PA): Elsevier Ltd. p. 43-56
- [ECDC] European Centre for Disease Prevention and Control, Surveillance Atlas of Infectious Diseases (internet). [updated 2017 May 31; accessed 2020 Jan 28] <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>
- [ECVP] European College of Veterinary Pathologists (internet). [accessed 2020 jun 13] <https://www.ecvpath.org/october-2012/>
- Ellis WA. 2015 Animal Leptospirosis. In: *Leptospira and Leptospirosis*. Adler B. Heidelberg: Springer. http://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_6
- Fernandes M, Vieira ML, Carreira T, Teodósio R. 2019. Sanitation workers from Portugal: Is there evidence of *Leptospira* spp? *Journal of Infection and Public Health*. 12(5):738 <http://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.02.001>
- Ferreira ASA. 2015. Molecular and Serological approaches for the Detection and Typing of *Leptospira* (Tese de Doutoramento). Porto: Universidade do Porto, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2004.11.005>
- [FMV-UL] Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa (internet). [updated 2001; accessed 2020 sep 22]. http://www.fmv.ulisboa.pt/atlas/urinario/paginas_pt/urin_035.htm

- Fraga TR. 2009. Estudo de Potenciais Antígenos Vacinais de *Leptospira Interrogans* Sorovar Copenhageni (Dissertação de Mestrado). São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas
- Furtado PFF. 2018. Inspeção Sanitária de Carnes e Principais Causas de Rejeição Total e Parcial em Ruminantes, Suínos e Solípedes (Dissertação de Mestrado). Lisboa: Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Faculdade de Medicina Veterinária
- Greene, CE, Sykes JE, Moore GE, Goldstein RE, Schultz RD. 2012. Chapter 42 Leptospirosis. In: Greene CE, editors. Infectious diseases of the dog and cat. 4th ed. Missouri: Elsevier Saunders.
- Greenwood D, Barer M, Slack R, Irving W. 2012. Medical Microbiology, A guide to Microbial Infections: Pathogenesis, immunity, laboratory investigation and control. 18th ed. Leicester: Elsevier Ltd.
- Haake DA, Chao G, Zuerner RL, Barnett JK, Barnett D, Mazel M, Matsunaga J, Levett PN, Bolin CA. 2000. The Leptospiral Major Outer Membrane Protein LipL32 Is a Lipoprotein Expressed during Mammalian Infection. *American Society for Microbiology*. 68 (4): 2276–2285
<https://doi.org/10.1128/iai.68.4.2276-2285.2000>
- Hartwig DD, Oliveira TL, Seixas FK, Forster KM, Rizzi C, Hartleven CP, McBride AJA, Dellagostin OA. 2010. High yield expression of leptospirosis vaccine candidates LigA and LipL32 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* Microbial Cell Factories. 9:98
<http://www.microbialcellfactories.com/content/9/1/98>
- [IHMT-UNL] Instituto de Higiene e Medicina Tropical – Universidade Nova de Lisboa (Internet). [updated 2020; accessed 2020 jun 11].
<https://www.ihmt.unl.pt/glossary/leptospirose/>
- Israel LFS, Duarte MT, Carrijo KF. 2014. Principais Causas de Condenação em Bovinos Abtidos em um Matadouro Frigorífico Sob Inspeção Oficial no Município de Rio Branco, Acre, Brasil. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer – Goiânia* 10(19): 1549-1562
- Junqueira LC, Carneiro J. 2013. *Histologia Básica*. 12th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Ltoa, Gen. p. 368-384
- Lafetá BN. 2010. Produção e caracterização da proteína recombinante LipL32 de *Leptospira spp.* (Tese de Doutorado). Belo Horizonte: Escola de Veterinária - UFMG
- Lagoa LMNS. 2010. Nefropatia Juvenil Canina. (Dissertação de Mestrado). Lisboa: Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária.
- Lima RDF. 2008. Estudo transversal das doenças abortivas de origem bacteriana no sistema de produção de bovinos leiteiros do concelho de Nordeste, São Miguel, Açores.(Dissertação de Mestrado). Lisboa: Universidade de Lisboa
- Mahouz F, Khoudja FB, Chikhaoui M. 2015. Pathological Study on renal Diseases in Cattle and Sheep. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 14(12): 357-360.

- McGeady TA, Quinn PJ, FitzPatrick ES, Ryan MT, Kilroy D, Lonergan P. 2017. Veterinary Embriology. 2nd ed. West Sussex: John Wiley & Sons, Ltd. p. 240-250
- Medeiros RS. 2019. Leptospirose: uma doença endémica em São Miguel. (Dissertação de Mestrado). Covilhã: Universidade da Beira Interior
- Mgode GF, Machang'u RS, Mhamphi GG, Katakweba A, Mulungu LS, Durnez L, Leirs H, Hartskeerl RA, Belmain SR. 2015. Leptospira Serovars for Diagnosis of Leptospirosis in Humans and Animals in Africa: Common Leptospira Isolates and Reservoir Hosts. PLOS Neglected Tropical Diseases 9(12): e0004251.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004251>
- Moreira PFR. 2012 Revisão teórica e casuística do Serviço de Doenças Infecciosas do Hospital de Santa Maria, Centro Hospitalar Lisboa Norte, E.P.E., de 2001 a 2011. Lisboa: Clínica Universitária de Doenças Infecciosas, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa.
- Mottola C, Alho, AM, Rafael T, Gonçalves T, Seixas R. 2015. Leptospirose em Portugal: Situação actual e importância das medidas de controlo no contexto da Saúde Pública. Revista Electrónica de Veterinária. 16(2): 1-16.
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63641398004>
- Nally JE, Hornsby RL, Alt DP, Bayles D, Wilson-Welder JH, Palmquist DE, Bauer NE. 2018. Isolation and characterization of pathogenic leptospires associated with cattle. Veterinary Microbiology. 218:25-30 <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.03.023>
- Norma Portuguesa ISO 19011 2012. Linhas de orientação para auditorias a sistemas de gestão. Instituto Português da Qualidade. Caparica
- Nourmohammadzadeh F, Haji Hajikolaei, MR, Sasani F, Alidadi N. 2010. Abattoir study of the prevalence of renal lesions in slaughtered cattle. International Journal of Veterinary Research. 4(3): 173-175.
<https://doi.org/10.22059/ijvm.2010.21349>
- Oliveira AVP. 2016. Acompanhamento das atividades do Médico Veterinário Oficial (Dissertação de Mestrado). Porto: Universidade do Porto, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar
- [OIE] World Organisation for Animal Health. 2018. Chapter 3.1.1.2. Leptospirosis. In: OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2018. 8th ed. Formato online disponível em:
<https://www.oie.int/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>
- [PAHO] Pan America Health Organization, World Health Organization. 2014. Leptospirosis in the Americas Region – Epidemiological Situation and Challenge. (Internet). 2016 [accessed 2020 nov 8].
<https://www.paho.org/en/documents/leptospirosis-americas-region-epidemiological-situation-and-challenges-2014>
- Picardeau M. 2017. Reviews. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita?. Institut Pasteur. Biology of Spirochetes Unit. National Reference Centre and WHO Collaborating Center for Leptospirosis. Paris, France.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.5>

Pinna MH, Martins G, Loureiro AP, Lilienbaum W. 2018. Detection of bovine carriers of *Leptospira* by serological, bacteriological, and molecular tools. *Tropical Animal Health and Production*. 50: 883-888
<https://doi.org/10.1007/s11250-018-1512-z>

Podgoršek D, Ružić-Sabljić E, Logar M, Pavlović A, Remec T, Baklan Z, Pal E, Certar T. 2020, Evaluation of real-time PCR targeting the lipL32 gene for diagnosis of *Leptospira* infection. *BMC Microbiology*. 20:59
<https://doi.org/10.1186/s12866-020-01744-4>

Regulamento (CE) N.º 999/2001 do Parlamento Europeu de 22 de maio de 2001 que estabelece regras para a prevenção, o controlo e a erradicação de determinadas encefalopatias espongiformes transmissíveis *Jornal Oficial da União Europeia*. Parlamento Europeu, Conselho da União Europeia.

Regulamento (CE) N.º 178/2002 do Parlamento Europeu de 28 de janeiro de 2002 que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*. Parlamento Europeu, Conselho da União Europeia.

Regulamento (CE) N.º 852/2004 do Parlamento Europeu de 29 de abril de 2004 relativo à higiene dos géneros alimentícios. *Jornal das Comunidades Europeias*. Parlamento Europeu, Conselho da União Europeia.

Regulamento (CE) N.º 853/2004 do Parlamento Europeu de 29 de abril de 2004 que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal. *Jornal das Comunidades Europeias*. Parlamento Europeu, Conselho da União Europeia.

Regulamento (CE) N.º 854/2004 do Parlamento Europeu de 29 de abril de 2004 que estabelece regras específicas de organização dos controlos oficiais de produtos de origem animal destinados ao consumo humano. *Jornal das Comunidades Europeias*. Parlamento Europeu, Conselho da União Europeia.

Regulamento (CE) N.º 882/2004 do Parlamento Europeu de 29 de abril de 2004 relativo aos controlos oficiais realizados para assegurar a verificação do cumprimento da legislação relativa aos alimentos para animais e aos géneros alimentícios e das normas relativas à saúde e ao bem-estar dos animais. *Jornal das Comunidades Europeias*. Parlamento Europeu, Conselho da União Europeia.

Regulamento 2075/2005 da Comissão de 5 de dezembro de 2005 que estabelece regras específicas para os controlos oficiais de deteção de triquinias na carne *Jornal Oficial da União Europeia*, Comissão das Comunidades Europeias.

Regulamento (CE) N.º 1099/2009 do Conselho de 24 de setembro de 2009 relativo à protecção dos animais no momento da occisão. *Jornal Oficial da União Europeia*, Conselho da União Europeia.

Regulamento (CE) N.º 219/2014 da Comissão de 7 de março de 2014 que altera o anexo I do Regulamento (CE) n.º 854/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho no que diz respeito aos requisitos específicos relativos aos procedimentos de inspeção post mortem de suínos domésticos. *Jornal Oficial da União Europeia*, Comissão Europeia.

Regulamento (UE) 2017/625 Do Parlamento Europeu e do Conselho de 15 de março de 2017 relativo aos controlos oficiais e outras atividades oficiais que visam assegurar a aplicação da legislação em matéria de géneros alimentícios e alimentos para animais e das regras sobre saúde e bem-estar animal, fitossanidade e produtos fitofarmacêuticos, que altera os Regulamentos (CE) n.o 999/2001, (CE) n.o 396/2005, (CE) n.o 1069/2009, (CE) n.o 1107/2009, (UE) n.o 1151/2012, (UE) n.o 652/2014, (UE) 2016/429 e (UE) 2016/2031 do Parlamento Europeu e do Conselho, os Regulamentos (CE) n.o 1/ /2005 e (CE) n.o 1099/2009 do Conselho, e as Diretivas 98/58/CE, 1999/74/CE, 2007/43/CE, 2008/119/ /CE e 2008/120/CE do Conselho, e que revoga os Regulamentos (CE) n.o 854/2004 e (CE) n.o 882/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, as Diretivas 89/608/CEE, 89/662/CEE, 90/425/CEE, 91/496/ /CEE, 96/23/CE, 96/93/CE e 97/78/CE do Conselho e a Decisão 92/438/CEE do Conselho (Regulamento sobre os controlos oficiais) que visa assegurar a aplicação da legislação em matéria de géneros alimentícios e alimentos para animais e das regras sobre saúde e bem-estar animal, fitossanidade e produtos fitofarmacêuticos. *Jornal Oficial da União Europeia*

Regulamento Delegado (UE) 2019/624 da Comissão de 8 de fevereiro relativo a regras específicas aplicáveis à realização de controlos oficiais da produção de carne e às zonas de produção e de afinação de moluscos bivalves vivos em conformidade com o Regulamento (UE) 2017/625 do Parlamento Europeu e do Conselho. *Jornal Oficial da União Europeia*

Regulamento de Execução (UE) 2019/627 da Comissão de 15 de março de 2019 que estabelece disposições práticas uniformes para a realização dos controlos oficiais de produtos de origem animal destinados ao consumo humano, em conformidade com o Regulamento (UE) 2017/625 do Parlamento Europeu e do Conselho, e que altera o Regulamento (CE) n.o 2074/2005 da Comissão no que se refere aos controlos oficiais. *Jornal Oficial da União Europeia*

Rude H, Agerholm JS, Maddox-Hyttel P, Christensen K, Flagstad P. 2005. Renal Lipofuscinosis in Danish Slaughter Cattle. *Journal of Comparative Pathology*. 132(4): 303-312. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2004.11.005>

Sakhae E, Abdollahpour G, Bolourchi M, Tabrizi SS. 2010. Comparison between microscopic agglutination test (MAT) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of leptospiral antibodies in cattle. *Comparative Clinical Pathology* 19: 5-9
<http://doi.org/10.1007/s00580-009-0907-7>

Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R. 2012. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology* ISSN 1364-5072
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>

[SESC] Suport a escorchadors (internet). [accessed 2020 out 20]
<http://www.cresa.cat/blogs/sesc/ronyo-de-taques-blanques-en-un-bovi/?lang=en>

Serrão AP, Abranches M, Ferra SJ. 2003. Diagnóstico pré-natal de uropatia: importância do desenvolvimento embriológico renal. *Actualidades Pediátricas*. 6(2): 19-22.
http://repositorio.chlc.minsaude.pt/bitstream/10400.17/972/1/Actualid%20Pediatr%202003_19.pdf

- Silva FAVS. 2017. Clínica e Cirurgia de Bovinos de Aptidão Leiteira (Dissertação de Mestrado). Évora: Universidade de Évora, Escola de Ciências e Tecnologia, Departamento de Medicina Veterinária
- Souza MA, Castro JR, Tavares TCF, Soares PM, Santos MP, Silva HO, Lima-Ribeiro AMC. 2012. Padronização e Validação de Elisa Indireto Para o Diagnóstico da Leptospirose Bovina. Bioscience Journal. 28(6): 993-999.
- Taghadosi V, Hosseinzadeh S, Shekardorush SS, Samiei A. 2016. Prevalence of renal lesions in slaughtered cattle in Shiraz, Iran, and detection of *Leptospira* in them by nested PCR-RFLP. Tropical Animal Health and Production. 48(8): 1691-1696. <https://doi.org/10.1007/s11250-016-1145-z>
- Teixeira MFS. 2002. Acompanhamento dos Actos de Inspecção Sanitária no Matadouro Industrial do Cachão. (Dissertação de Mestrado). Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro
- Teodoro PH. 2009. Caracterizações Biológicas das Proteínas LipL32 e HlyX de *Leptospira interrogans* Sorovar Copenhageni. São Paulo: USP, Instituto Butantan
- Uzal FA, Dobrenov B, Smythe L, Norris M, Dohnt M, Symonds M, O'Boyle D, Shouten F, Kelly WR. 2002. A study of "white spotted kidneys" in cattle. Veterinary Microbiology 86: 369–375. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00021-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00021-4)
- Valencia MMC. 2014. Interação de Proteínas de Membrana de *Leptospira* Com os Reguladores Fator H e C4BP do Sistema Complemento Humano. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, Faculdade de Imunologia
- Vincent AT, Schiettekatte O, Goarant C, Neela VK, Bernet E, Thibeaux R, Ismail N, Khalid MKNM, Amran F, Masuzawa T, Nakao R, Korba AA, Bourhy P, Veyrier FJ, Picardeau M. 2019. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. PLOS Neglected Tropical Diseases 13(5):e0007270. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007270>
- [WHO] World Health Organization; International Leptospirosis Society. Human Leptospirosis: Guidance For Diagnosis, Surveillance And Control (Internet). 2003 [accessed 2020 out 10]. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42667/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.23.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Yang CW, Pan MJ, Yang HY. 2019. Leptospirosis and the Kidney. Basel: Karger
- Zachary JF. 2017. Pathologic Basis of Veterinary Medicine. 6th ed. St. Louis: Elsevier Ltd.