



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ROBERTA TORRES CHIDEROLI

LEPTOSPIROSE BOVINA:
SOROVAR HARDJO GENÓTIPOS HARDJOBVIS E
HARDJOPRAJITNO

ROBERTA TORRES CHIDEROLI

LEPTOSPIROSE BOVINA:
SOROVAR HARDJO GENÓTIPOS HARDJOBÓVIS E
HARDJOPRAJITNO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Julio Cesar de Freitas

Londrina
2016

C533L Chideroli, Roberta Torres

Leptospirose Bovina: sorovar Hardjo genótipos Hardjobovis e Hardjoprajitno. – Londrina, 2016.
48 f. : il.

Orientador: Julio Cesar de Freitas

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2016.
Inclui bibliografia.

1. Bovinos – Doenças – Teses. 2. Leptospirose em animais– Teses. I. Freitas, Julio Cesar de. II. Universidade Estadual de Londrina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619:636.2

ROBERTA TORRES CHIDEROLI

LEPTOSPIROSE BOVINA:

SOROVAR HARDJO GENÓTIPOS HARDJOBVIS E HARDJOPRAJITNO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Julio Cesar de Freitas
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Ulisses de Padua Pereira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Daniela Dib Gonçalves
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 19 de Fevereiro de 2016.

*A minha família pela força e perseverança e a todas
as pessoas que passaram pela minha vida neste
período e deixaram um pouco delas em mim, que me
fizeram sorrir ou estiveram ao meu lado quando me
sentia perdida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, principal apoio para que eu não tropeçasse em meio às adversidades e provações.

Ao meu orientador Julio Cesar de Freitas não só pela orientação nestes anos todos de trabalho, mas, sobretudo pela amizade, paciência, confiança e por enxergar em mim o potencial que nem eu mesma via; por se dedicar em me fazer desenvolvê-lo. Obrigada pela amizade, o interesse pela minha vida pessoal, os conselhos, as críticas que me faziam refletir, ainda que mais tarde.

Aos meus pais Deisi Torres e Luiz Roberto Chideroli que sempre me incentivaram nos estudos e acreditaram em mim.

Aos meus familiares em especial a minha tia Laura Torres Siriani aqui deixo toda minha gratidão pelo apoio e suporte familiar durante todo o segundo ano do mestrado, sem você eu não teria conseguido finalizar este trabalho.

A minha segunda família em Londrina José Helio Rodrigues, Marly Eliza Hespanhol Rodrigues, Beatriz Nayara Rodrigues Tonin, Ana Carolina Espanhol Rodrigues que me ajudaram desde quando cheguei a Londrina e estiveram comigo durante esses anos de caminhada.

A todos os meus amigos de infância até agora, em especial a Talita Bianca Brunharo pela paciência e apoio inicial neste trabalho, por me incentivar e estar sempre presente quando precisei de ajuda. Meus colegas de turma, Mércia, Joice, Cristiane, José, Gabriel e muitos outros que fizeram as aulas mais divertidas.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal pela formação acadêmica científica. Em especial quero deixar meu muito obrigada ao Professor Dr. Ulisses Pereira de Padua por todo ensinamento, confiança e amizade.

A Professora da Unipar, Daniela Dib Gonçalves pelo suporte dado no início do experimento realizado em Umuarama, pela amizade, ensinamentos e principalmente pelos momentos de risadas.

Aos professores Dr. Amauri Alcindo Alfieri e Alice Fernandes Alfieri por me acolher em seu laboratório, e toda equipe do laboratório de Virologia Animal pela paciência em me receber e auxiliar na realização das técnicas moleculares.

A todos os integrantes do laboratório de Leptospirose em especial as técnicas Lucimara Aparecida Alves e Cristiane da Silva pela amizade e por ter me passado conhecimentos únicos sobre a rotina laboratorial da leptospirose, também essencial para a conclusão deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da Bolsa de Mestrado.

A todos os outros colaboradores que de alguma forma também ajudaram na realização deste trabalho, muito obrigada.

Às leptospiras.....

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

CHIDEROLI, Roberta, Torres. **Leptospirose Bovina:** sorovar Hardjo genótipos Hardjobovis e Hardjoprajitno. 2016. 48 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2016.

RESUMO

A leptospirose bovina é uma doença endêmica nos rebanhos brasileiros, sendo os bovinos considerados hospedeiros de manutenção do sorovar Hardjo e as principais manifestações clínicas nesta espécie estão relacionadas à diminuição do desempenho reprodutivo. Esse sorovar possui dois genótipos: Hardjobovis e Hardjoprajitno. O genótipo Hardjobovis pertence à espécie *Leptospira borgpetersenii* e o genótipo Hardjoprajitno à espécie *Leptospira interrogans*. Apesar de ambos causarem problemas reprodutivos nos rebanhos bovinos de todo o mundo, existem diferenças epidemiológicas entre eles. A infecção causada pelo genótipo Hardjobovis é caracterizada pela forma subclínica, ocasionando principalmente aborto; enquanto que o genótipo Hardjoprajitno, caracteriza-se por ser mais patogênica ocasionando problemas reprodutivos e também queda da produção de leite. Apesar de não corresponder com a classificação sorológica, atualmente os melhores métodos de diagnóstico para a leptospirose são aqueles que utilizam ferramentas moleculares. O isolamento bacteriológico, a correta caracterização e identificação genética são extremamente importantes para a compreensão da etiologia, epidemiologia e patogênese das diferentes espécies e genótipos de leptospiros. O objetivo deste trabalho foi isolar e identificar características moleculares através do *Multilocus variable-number tandem-repeat (VNTR) analysis (MLVA)* e o sequenciamento parcial do gene *sec Y* de duas cepas isoladas de *Leptospira* em amostras de urina de bovinos naturalmente infectados de rebanhos leiteiros. Foram selecionadas quinze vacas leiteiras reagentes no teste de soroaglutinação microscópica (SAM) com títulos entre 400 e 800 para o sorovar Hardjo e histórico de falha reprodutiva, tais como aborto e infertilidade. As amostras de urina obtidas de cada animal foram imediatamente semeadas em tubos contendo meio de cultura Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH). Das 15 amostras de urina avaliadas, duas leptospiros foram isoladas e nomeadas Londrina 49 e Londrina 54. O perfil MLVA e o sequenciamento parcial do gene *sec Y* caracterizaram os isolados como *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo genótipo Hardjobovis diferenciando-os da cepa de referência Hardjoprajitno. Este é o primeiro isolamento da *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo genótipo Hardjobovis obtido no Brasil e na América Latina. Portanto, mais estudos são necessários incluindo o isolamento e caracterização molecular de cepas regionais para obter um melhor conhecimento sobre a epidemiologia do sorovar Hardjo em bovinos o que podem ajudar em futuras estratégias de prevenção e controle da leptospirose bovina.

Palavras-chave: Diagnóstico. Cultura bacteriana. *Leptospira borgpetersenii*. Identificação de isolados.

CHIDEROLI, Roberta Torres. **Bovine leptospirosis:** serovar Hardjo genotypes Hardjobovis and Hardjoprajitno. 2016. 48 p. Dissertation (Master's Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2016.

ABSTRACT

Bovine leptospirosis is an endemic disease in bovine Brazilian herds, and the cattle are considered the serovar Hardjo maintenance hosts and the clinical manifestations in this species are related to decreased reproductive performance. This serovar has two genotypes: Hardjobovis and Hardjoprajitno. The genotype Hardjobovis belongs to the specie *Leptospira borgpetersenii* and Hardjoprajitno genotype to the specie *Leptospira interrogans*. Although both cause reproductive failure in cattle herds around the world, there are epidemiological differences between them. The infection caused by Hardjobovis genotype is characterized by subclinical form, especially causing abortion; while Hardjoprajitno genotype, is more pathogenic causing reproductive problems and also decreased milk production. Although not correspond with the serological classification, currently the best diagnostic methods for leptospirosis are those using molecular tools. The bacterial isolation, the correct characterization and genetic identification are important for understanding the etiology, epidemiology and pathogenesis of the different specie and genotype of *Leptospira*. The objective of this study was to isolate and identify molecular characteristics through Multilocus variable-number tandem repeat (VNTR) analysis (MLVA) and sequencing of the *sec Y* partial gene of two isolated strains of *Leptospira* in urine samples from bovine naturally infected of dairy herds. Fifteen dairy cows reagents in the microscopic agglutination test (MAT) with titles between 100 and 800 for the serovar Hardjo and history of reproductive failure were selected, such as abortion and infertility. The urine samples obtained from each animal were immediately seeded in tubes containing culture medium Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH). The identification of the isolates was performed by Multilocus variable-number tandem-repeat (VNTR) analysis (MLVA) technique and phylogenetic analysis of partial sequence of gene *sec Y*. From the 15 urine samples evaluated, two leptospires were isolated and named Londrina 49 and Londrina 54 strains. The MLVA profile and partial sequencing of gene *sec Y* characterized the isolates as *L. borgpetersenii* serovar Hardjo genotype Hardjobovis differing them from Hardjoprajitno reference strain. Therefore, more studies are needed including isolation and molecular characterization from regional strains to obtain a better knowledge about epidemiology of serovar Hardjo in bovine which may assist in future strategies of prevention and control of bovine leptospirosis.

Keywords: Diagnosis. Bacterial culture. *Leptospira borgpetersenii*. Typing isolates.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figure 1 – Banding patterns of VNTR visualized with an agarose gel.....	43
Figure 2 – Banding patterns of VNTR visualized with an agarose gel.....	43
Figure 3 – Neighbor-joining phylogenetic tree of <i>sec Y</i> gene	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sorogrupos e alguns sorovares de <i>Leptospira interrogans</i> lato sensu.....	16
Tabela 2 – Genomospécies de leptospiras associados aos sorogrupos.....	17

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	ASPECTOS HISTÓRICOS	14
2.2	TAXONOMIA E CLASSIFICAÇÃO	14
2.3	ASPECTOS BIOLÓGICOS	17
2.4	ASPECTOS MOLECULARES	18
2.5	MEIOS DE CULTURA	19
2.6	EPIDEMIOLOGIA	20
2.7	PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS	21
2.8	DIAGNÓSTICO	22
2.9	IDENTIFICAÇÃO E TIPIFICAÇÃO DE ISOLADOS	25
2.10	CONTROLE E PREVENÇÃO	27
2.11	VACINA	28
	REFERÊNCIAS	30
3	OBJETIVOS	39
3.1	OBJETIVO GERAL	39
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICO	39
4	ARTIGO A – ISOLATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF <i>LEPTOSPIRA BORGPETERSENII</i> SEROVAR HARDJO STRAIN HARDJOBOWIS IN THE URINE OF NATURALLY INFECTED CATTLE IN BRAZIL.	40
	ABSTRACT	40
	INTRODUCTION	40
	MATERIALS AND METHODS	41
	RESULTS AND DISCUSSION	42
	ACKNOWLEDGEMENTS	45
	REFERENCES	45
6	CONCLUSÃO	48

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença infectocontagiosa que acomete animais e humanos, causada por qualquer espécie patogênica de bactérias do gênero *Leptospira* spp. (FAINE et al, 1999), sendo uma das principais enfermidades causadoras de problemas reprodutivos em bovinos no Brasil e no mundo (BRASIL, 1995; CHIARELI et al, 2012). Nesta espécie, a disseminação e a manutenção da leptospirose são caracterizadas principalmente pela presença de animais infectados ou portadores assintomáticos que eliminam a bactéria pela urina, descargas cérvico-vaginal, fetos abortados e placenta (FAINE et al. 1999). A leptospirose bovina é uma doença endêmica nos rebanhos brasileiros e os bovinos considerados hospedeiros de manutenção do sorovar Hardjo. As principais manifestações clínicas nesta espécie estão relacionadas à diminuição do desempenho reprodutivo, caracterizado por abortos, morte embrionária, repetição deaios, natimortos, nascimento de bezerros fracos, infecções (metrite e mastite) e diminuição temporária da produção leiteira (CERVANTES et al. 2002).

O sorovar Hardjo possui dois genótipos: Hardjobovis e Hardjoprajitno. O genótipo Hardjobovis pertence à espécie *Leptospira borgpetersenii* e o genótipo Hardjoprajitno à espécie *Leptospira interrogans*. Apesar de ambos causarem problemas reprodutivos nos rebanhos bovinos de todo mundo, existem diferenças epidemiológicas entre eles (BULACH et al., 2006).

Para um diagnóstico preciso da infecção por *Leptospira* em bovinos é necessário o isolamento e tipificação do sorovar prevalente no rebanho. No entanto, na maioria dos estudos publicados no Brasil, são realizados apenas inquéritos sorológicos através da soroaglutinação microscópica (SAM), devido à dificuldade da obtenção do isolamento para a identificação do agente (CHIARELI et al, 2012). No entanto, a SAM apresenta algumas limitações, além de não permitir a identificação do genótipo específico, pode gerar reações cruzadas entre espécies do gênero *Leptospira* com características antigênicas similares, alto custo de manutenção de uma bateria de leptospirosas vivas, necessidade de representantes de diversos sorogrupos e realização de repiques semanais (CUMBERLAND et al., 1999; HEINEMANN et al., 1999; RIBEIRO et al., 1996; SMYTHE et al., 2002; SUGUNAN; VIJAYACHARI; SEHGAL, 2001).

Para realizar a caracterização e tipificação das cepas e das amostras isoladas de leptospirosas são utilizadas técnicas moleculares, entre elas, a *multiple-locus variable-number tandem repeat analysis* (MLVA) (MAJED et al., 2005). Salaün et al. (2006)

melhoraram a MLVA descrita por Majed et al (2005) para permitir a tipificação não só de cepas da *L. interrogans*, mas também daquelas pertencentes às outras duas espécies patogênicas, *L. borgpetersenii* e *L. Kirschneri*.

Apesar de não corresponder com a classificação sorológica, atualmente os melhores métodos de diagnóstico para a leptospirose são aqueles que utilizam ferramentas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), o MLVA e o sequenciamento genético da espécie. Segundo Lilenbaum e Martins (2014), o isolamento bacteriológico, a correta caracterização e a identificação genética são extremamente importantes para a compreensão da etiologia, epidemiologia e patogênese das diferentes espécies de leptospiros.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS HISTÓRICOS

O primeiro relato de leptospirose em bovinos foi na Rússia, por Mikhin e Azhinov (1935), onde leptospirosas foram isoladas de bezerros com hemoglobinúria infecciosa aguda. A partir de então, pesquisadores de diferentes países começaram a investigar a ocorrência da leptospirose nesta espécie animal (YANAGAWA et al., 1955).

No final da década de 50, surgiram os primeiros trabalhos sobre a leptospirose bovina no Brasil, com a identificação da infecção pelo sorovar Pomona em um feto bovino (FREITAS, 1957). Este fato despertou grande interesse por parte de pesquisadores brasileiros, e a pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira* em rebanhos bovinos e o isolamento do agente passaram a ser realizados com maior interesse no Brasil (LILENBAUM, 1996). Vários estudos de prevalência foram realizados demonstrando que a doença está presente nos rebanhos bovinos brasileiros (HASHIMOTO et al., 2012; SILVA et al., 2012). Dentre eles, Favero et al. (2001) analisaram exames de SAM efetuados no período de 1984 a 1997 em 31.325 bovinos de 1920 propriedades distribuídas em 540 municípios de 21 estados do Brasil e os resultados revelaram que 84,1% das propriedades e 94,18% dos municípios apresentavam pelo menos uma amostra positiva para a leptospirose.

2.2 TAXONOMIA E CLASSIFICAÇÃO

A leptospirose é uma doença infectocontagiosa causada por bactérias pertencentes à Ordem *Spirochaetales*, à família *Leptospiraceae* e ao gênero *Leptospira*. Atualmente, dois tipos de classificação coexistem: uma baseada em características genéticas e a outra em características antigênicas (LEVETT, 2001).

A classificação sorológica das leptospirosas adota critérios relacionados a reações sorológicas relativamente específicas que fornecem os sorogrupos e sorovares de leptospirosas patogênicas e saprófitas (QUINN et al., 1994). O gênero *Leptospira* foi inicialmente dividido, com base em características antigênicas em duas espécies: *Leptospira interrogans*, que engloba grande número de sorovariedades patogênicas e *Leptospira biflexa* sorovariedades de comportamento saprófita (LEVETT, 2001). Esta divisão, com critérios relacionados às reações sorológicas, apresenta na atualidade mais de 320 sorovares de leptospirosas patogênicas e saprófitas (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). O

polissacarídeo “O” do lipopolissacarídeo (LPS) é considerado um importante determinante antigênico e por isso utilizado para a classificação sorológica (FAINE, 1994). Cada sorovar é representado por uma cepa de referência, o qual é determinado por testes de aglutinação cruzada e teste de absorção de aglutininas. Foi definido, em 1987, pelo Subcomitê de Taxonomia de leptospirose que duas cepas pertencem a um mesmo sorovar se menos de 10% dos anticorpos homólogos permanecerem em ambos os soros após a absorção. Deste modo, duas cepas pertencem a sorovares diferentes quando 10% ou mais dos anticorpos homólogos persistirem em pelo menos um dos dois antissoros após a absorção. Os sorovares que apresentarem alguma semelhança sorológica, mas com diferenças antigênicas individuais, são reunidos em sorogrupos (FAINE et al., 1999) (Tabela 1).

A utilização de ferramentas de biologia molecular proporcionou uma nova perspectiva à taxonomia das leptospiros. Yasuda et al. (1987) mostraram a presença de heterogeneidade genômica dentro do gênero *Leptospira* e propuseram novas espécies genômicas patogênicas e saprófitas baseadas na homologia do seu DNA. Nesta primeira classificação baseada na diferenciação molecular entre os diversos sorovares, o gênero *Leptospira* foi dividido em seis espécies patogênicas: *L. borgpetersenii*, *L. interrogans*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. weilli* e *L. kirschneri*; inclusas nas genomospécies (QUINN et al., 1994). Segundo Baranton (1998), o grupo de Genética Molecular de Leptospiros do Instituto Pasteur de Paris, utilizando o método de hidroxapatita no estudo da relação entre o DNA dos diversos sorovares de leptospiros, propôs um modelo de classificação em espécies genômicas ou genomospécies, incluindo novas espécies às acima citadas. Atualmente, com a facilidade do sequenciamento genético foram descobertos novos sorovares e novas espécies sendo aceitas 23 genomospécies: *L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. wolbachii*, *L. noguchi*, *L. interrogans*, *L. inadai*, *L. weilli*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. kirshneri*, *L. fainei*, *L. alexanderi*, *L. broomii*, *L. wolffii*, *L. kmetyi*, *L. licerasiae*, *L. alstonii* (genomospécies 1), *L. idonii*, *L. terpstra* (genomospécies 3), *L. vanthielii* (genomospécies 4), *L. yanagawae* (genomospécies 5), *L. mayottensis*, *Turneriella parva* (LEVETT; SMYTHE, 2014; PARTE, 2016). No entanto, as genomospécies de *Leptospira* não correspondem obrigatoriamente aos sorogrupos e sorovares existentes na classificação sorológica, pois os estudos realizados incluíram múltiplos genótipos de alguns sorovares em diferentes genomospécies, demonstrando a heterogeneidade genética dentro dos sorovares (BRENNER et al., 1999; FERESU et al., 1999) (Tabela 2). Por isso, a classificação molecular é problemática para o microbiologista clínico, sendo incompatível com o sistema de sorogrupos utilizados há muitos anos pelos clínicos e epidemiologistas (LEVETT, 2001).

Tabela 1 - Sorogrupos e alguns sorovares de *Leptospira interrogans* lato sensu.

Sorogrupos	Sorovariedades
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Lai, Zimbabwe
Hebdomadis	Hebdomadis, Jules, Kremastos
Autumnalis	Autumnalis, Fortbragg, Bim, Weeransinghe, Butembo
Pyrogenes	Pyrogenes
Bataviae	Bataviae, Brasiliensis
Grippotyphosa	Grippotyphosa, Canalzonae, Rratnapura
Canicola	Canicola
Australis	Australis, Bratislava, Lora
Pomona	Pomona
Javanica	Javanica
Sejroe	Sejroe, Saxkoebing, Hardjo, Wolff
Panamá	Panama, Mangus
Cynopteri	Cynopteri
Djasiman	Djasiman, Sentot
Sarmin	Sarmin
Mini	Mini, Geórgia
Tarassovi	Tarassovi
Ballum	Ballum, Aroberea, Castellonis
Celledoni	Celledoni
Louisiana	Lousiana, Lanka
Ranarum	Ranarum
Manhao	Manhao
Shermani	Shermani
Hurstbridge	Hurstbridge

Fonte: Adaptado de Lafetá, 2010.

Tabela 2 - Genomospécies de leptospiiras associados aos sorogrupos

Sorogrupos	Genomospécies
Andamana	<i>L. biflexa</i>
Australis	<i>L. interrogans, L. noguchii, L. borgpetersenii, L. Kirschneri</i>
Autumnalis	<i>L. interrogans, L. noguchii, L. satarosai, L. borgpetersenii, L. Kirschneri</i>
Ballum	<i>L. borgpetersenii</i>
Bataviae	<i>L. interrogans, L. noguchii, L. satarosai, L. borgpetersenii, L. Kirschneri</i>
Canicola	<i>L. interrogans, L.inadai, L. Kirschneri</i>
Códice	<i>L. wolbachii</i>
Cynopteri	<i>L. satarosai, L. Kirschneri</i>
Djasiman	<i>L. interrogans, L. noguchii, L. Kirschneri</i>
Grippotyphosa	<i>L. interrogans, L. satarosai, L. Kirschneri</i>
Hebdomadis	<i>L. interrogans, L. satarosai, L. Kirschneri, L. weilli, L. borgpetersenii, L. alexanderi</i>
Hurstbridge	<i>L. fainei</i>
Icterohaemorrhagiae	<i>L. interrogans, L. satarosai, L. Kirschneri, L. weilli, L.inadai</i>
Javanica	<i>L. weilli, L. satarosai, L. borgpetersenii, L. meyeri, L.inadai, L. alexanderi</i>
Lousiana	<i>L. interrogans, L. noguchii</i>
Lyme	<i>L.inadai</i>
Manhao	<i>L. weilli, L.inadai, L. alexanderi</i>
Mini	<i>L. interrogans, L. satarosai, L. borgpetersenii, L. weilli, L. alexanderi, L. meyeri</i>
Panamá	<i>L. noguchii, L.inadai</i>
Pomona	<i>L. interrogans, L. noguchii, L. satarosai, L. Kirschneri</i>
Pyrogenes	<i>L. interrogans, L. noguchii, L. satarosai, L. weilli, L. borgpetersenii</i>
Ranarum	<i>L. interrogans, L. meyeri</i>
Sarmin	<i>L. interrogans, L. satarosai, L. weilli</i>
Sejroe	<i>L. interrogans, L. satarosai, L. weilli, L. Kirschneri, L. borgpetersenii, L. meyeri</i>
Semaranga	<i>L. meyeri, L. biflexa</i>
Shermani	<i>L. noguchii, L. satarosai, L.inadai</i>
Tarassovi	<i>L. noguchii, L. satarosai, L.inadai, L. weilli, L. borgpetersenii</i>

Fonte: Lafetá, 2010

2.3 ASPECTOS BIOLÓGICOS

As leptospiiras são bactérias espiraladas, muito finas (0,1 µm de diâmetro) e com comprimento variando de 6 a 20 µm, apresenta as extremidades em forma de gancho e dois filamentos axiais (flagelo periplásmico) que facilitam sua motilidade (QUINN et al., 1994). A organização estrutural e a composição química dessas bactérias são semelhantes às de outras bactérias Gram-negativas: membrana externa que envolve toda a célula, os filamentos axiais denominados de flagelos periplasmáticos e os cilindros protoplasmáticos, que incluem a membrana celular e a capa de peptidoglicano da parede celular (FAINE,

1982). Possui também um envelope externo que é composto por LPS e mucopeptídeos antigênicos (GREENE, et al., 2006). A visualização de leptospiras em preparação a fresco só é possível por microscopia de campo escuro e de contraste de fase e também apresenta afinidade tintorial pelos corantes argênticos (BEER, 1999; BRASIL, 1995; FAINE et al., 1999).

As leptospiras são micro-organismos aeróbios estritos e crescem muito bem em temperaturas de 28 a 30°C; possuem multiplicação e crescimento lentos, com tempo de geração em torno de sete a 12 horas; e são exigentes no que se refere a meios nutritivos (HANSON, 1982). Uma cultura em meio líquido leva de cinco a sete dias para atingir crescimento satisfatório para ser utilizada como antígeno (BEER, 1999; FAINE et al., 1999). As leptospiras são pouco resistentes à luz solar direta, aos desinfetantes comuns e aos antissépticos; e no meio ambiente, os sorovares patogênicos requerem para sua sobrevivência solo com pH em torno de 7,2 a 7,4 e com bastante umidade. Todas as leptospiras são sensíveis em pH ácido de 6,8 ou menos, porém sobrevivem em condições alcalinas em pH entre 7,8 e 7,9 (FAINE et al., 1999).

2.4 ASPECTOS MOLECULARES

Atualmente, seis genomas completos do gênero *Leptospira* estão disponíveis em bancos públicos de dados: as saprófitas *L. biflexa* cepa Paris e *L. biflexa* cepa Ames (PICARDEAU et al., 2008); e as patogênicas, *L. interrogans* cepa L1-130 e *L. interrogans* cepa Lai (NASCIMENTO et al., 2004); *L. borgpetersenii* cepa L550 e *L. borgpetersenii* cepa JB197 (BULACH et al., 2006).

Ambas as espécies patogênicas sequenciadas possuem dois cromossomos circulares, sendo um maior e outro menor, com aproximadamente 4,3 Mb e 350 Kb na *L. interrogans*, e 3,6 Mb e 300 Kb na *L. borgpetersenii* (NASCIMENTO et al., 2004). A espécie saprofítica, *L. biflexa*, possui além de dois cromossomos, com 3,6 Mb e 270 Kb, um terceiro replicon circular denominado P74, ausente nas leptospiras patogênicas, com aproximadamente 74 Kb. No início, o replicon P74 foi considerado um cromossomo (PICARDEAU et al., 2008), mas embora possua genes essenciais de metabolismo basal presente no cromossomo maior das espécies patogênicas, hoje ele é considerado um elemento extracromossomal ou plasmídeo (XUE; YAN; PICARDEAU, 2009).

Picardeau et al. (2008), compararam os sequenciamentos destas 3 espécies demonstraram que 61% dos genes estão presentes em todos os genomas sequenciados e

distribuídos nos dois cromossomos circulares da *Leptospira*. Considerando que os mecanismos moleculares da patogênese das leptospiras ainda são desconhecidos, e que 893 dos 1431 genes exclusivos das espécies patogênicas, sem ortólogos em *L. biflexa* não têm função definida, estes autores sugeriram que esse conjunto de genes pode representar os genes responsáveis pela patogênese.

Outro dado obtido dos estudos genômicos é a ocorrência de um grande número de elementos genéticos móveis (IS – *insertion sequences*). Há mais de 120 IS no genoma de *L. borgpetersenii*, 26 na *L. interrogans* sorovar Copenhageni, 57 no sorovar Lai e 9 na *L. biflexa*. Esse indicativo de plasticidade genômica sugere a participação dos IS no processo de diferenciação das espécies do gênero *Leptospira* (PICARDEAU et al., 2008). Uma das teorias é que os IS tenham participação na redução genômica da *L. borgpetersenii*, que é 16% menor que da espécie *L. interrogans* (BULACH et al., 2006). Assim, vários estudos dos genes que codificam proteínas imunogênicas e virulentas estão sendo realizados para uma melhor compreensão da patogenia da leptospirose e para o desenvolvimento de vacinas (VIEIRA, 2008; HASHIMOTO, 2012).

2.5 MEIOS DE CULTURA

Existem vários meios de cultura artificiais para o isolamento e manutenção de leptospiras, podendo se apresentar tanto na forma líquida (a mais utilizada) quanto nas formas semi-sólida ou sólida (SOBOLEVA, 1983; ADLER et al., 1986; FAINE et al., 1999). Para o isolamento ou manutenção dos sorovares mais fastidiosos são utilizados suplementos como o Tween 80 e a adição de albumina sérica bovina (BSA) fração V (ADLER et al., 1986), ou soro de coelho (FAINE et al., 1999). Muitos meios líquidos contendo soro de coelho já foram descritos por Fletcher, Korthoff, Noguchi e Stuart (TURNER, 1970). O meio mais utilizado atualmente é o EMJH (ELLINGHAUSEN; MCCULLOUGH, 1965; JOHNSON; HARRIS, 1967), este é comercializado por vários laboratórios e já contém Tween 80 e BSA.

Outro meio de cultura empregado é o descrito por Turner (TURNER, 1970), onde a base é o EMJH, com algumas modificações (ALVES et al., 1996). A adição do antibiótico 5-fluorouracil (um análogo da pirimidina), inibe o crescimento de microorganismos contaminantes, sendo muito utilizado na preparação de meios seletivos e na descontaminação de culturas, pois as leptospiras não incorporam bases pirimídicas (JOHNSON; FAINE, 1984).

2.6 EPIDEMIOLOGIA

A distribuição da leptospirose é cosmopolita, porém sua ocorrência é favorecida em regiões de clima tropical e subtropical, onde as elevadas temperaturas e os altos níveis pluviométricos favorecem a sobrevivência do micro-organismo (FAINE et al., 1999). A ocorrência da leptospirose é variável em diferentes partes do mundo, podendo ser observada tanto a forma esporádica quanto a endêmica (BATISTA et al., 2004).

A leptospirose pode ser dividida quanto à relação sorovar/hospedeiro. Os animais, incluindo o homem, podem ser divididos em hospedeiro de manutenção e hospedeiro acidental, sendo a doença mantida na natureza pela infecção crônica dos túbulos renais dos hospedeiros de manutenção (LEVETT, 2001). Apesar de cada sorovar de *Leptospira* ser adaptado a um determinado animal ou espécie (hospedeiro de manutenção), este pode servir como fonte de infecção para animais de outras espécies que se tornarão hospedeiros acidentais (ELLIS, 1995; RADOSTITS et al., 2002).

Os roedores são os principais mantenedores tanto da leptospirose urbana quanto da leptospirose do meio rural, pois não morrem em decorrência da infecção. Sua urina e o tecido renal com pH alcalino são favoráveis para a sobrevivência do micro-organismo, permitindo uma colonização nos túbulos renais e eliminação da bactéria via urina por toda sua vida (SILVA, 1998). Os ratos, principalmente o *Rattus norvegicus* são reservatórios de sorovares dos sorogrupos Icterohaemorrhagiae e Ballum. Outros animais também podem ser hospedeiros de manutenção (reservatórios). Os bovinos podem abrigar os sorovares Pomona, Hardjo e Grippotyphosa; os ovinos, Hardjo e Pomona; os suínos, Pomona, Bratislava e Tarassovi; e os cães o sorovar Canicola (BARCELLOS et al., 2003; BHARTI et al., 2003). Conhecer os sorovares prevalentes e os hospedeiros de manutenção de cada região é muito importante para o entendimento epidemiológico da doença, pois a prevalência de diferentes sorovares dentro de uma população depende dos reservatórios presentes nessa região e dos sorovares que eles albergam (BHARTI et al., 2003). O sorovar Hardjo é considerado o mais adaptado à espécie bovina, que pode comportar-se como reservatório, pois uma vez introduzido em um rebanho, este sorovar estabelece níveis variáveis de infecção, podendo persistir por longos períodos (HATHAWAY et al., 1986).

Na década de 80, o sorovar Hardjo foi incluído nas baterias de antígeno dos laboratórios do Brasil para a realização da SAM, com isso mais pesquisas foram realizadas para melhor compreensão epidemiológica deste sorovar nos rebanhos brasileiros. O sorovar Hardjo passou a ser detectado como o mais prevalente na espécie bovina na Europa, na

Oceania e também nas América (Norte e Sul) e incluindo o Brasil (LILENBAUM, 1996; BOLIN; ALT, 1999). No Brasil, este sorovar é considerado um dos mais difundidos nesta espécie animal (CASTRO et al., 2008; FIGUEIREDO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2009; HASHIMOTO et al., 2012). Sua transmissão ocorre principalmente pelo contato direto com a urina contaminada e os animais infectados podem eliminar o agente por vários meses mesmo após a sua cura clínica (FAINE et al., 1999). A infecção do sistema genital da fêmea e do macho também é outra forma de manutenção da leptospirose nos rebanhos bovinos, pois a eliminação do micro-organismo também pode ocorrer através de descargas uterinas pós-aborto, feto ou placenta infectada, infecções uterinas e sêmen (ELLIS, 1994).

Os outros sorovares encontrados, como Bratislava e Pomona, estão relacionados às chamadas infecções acidentais e envolvidas com o contato direto ou indireto do bovino com outras espécies, principalmente suínos, além de outras variáveis, como índice pluviométrico, região geográfica e sistema de produção adotado na propriedade (LILENBAUM; SANTOS, 1995).

2.7 PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS

A patogenia das leptospirosas inclui a penetração ativa dos micro-organismos pelas mucosas (ocular, digestiva, respiratória, genital), pele escarificada e inclusive pele íntegra, em condições que favoreçam a dilatação dos poros (MANUAL DE LEPTOSPIROSE, 1997). Após a penetração, ocorre a multiplicação no espaço intersticial e nos humores orgânicos (sangue, linfa e liquor), caracterizando um quadro agudo septicêmico denominado de leptospiremia (MYYERS, 1985). A extensão dos danos causados aos órgãos internos é variável e depende da virulência do sorovar e suscetibilidade do hospedeiro, entretanto como a *Leptospira* spp. se replica e persiste nas células epiteliais dos túbulos renais a colonização renal ocorre na maioria dos animais infectados (MATHEWS; MONTEITH, 2007), local onde o agente fica protegido da imunidade humoral (FAINE et al, 1999). A partir desta localização as leptospirosas passam a ser eliminadas na urina (leptospirúria) por períodos variáveis entre dias a anos. Tal fato explica a existência de portadores renais, fator primordial na epidemiologia da leptospirose, onde a transmissão ocorre pela exposição à urina de animais infectados (PLANK; DEAN, 2000; ACHA; SZYFRES, 2003).

Nos bovinos, além de permanecerem nos túbulos renais, ocorre a colonização de diferentes estruturas do aparelho genital das fêmeas bovinas (útero, ovário, oviduto e vagina) e dos machos (testículos, epidídimo e vesícula seminal), comprometendo o

desempenho reprodutivo (ELLIS, 1994, FAINE et al., 1999). Os abortamentos causados pelo sorovar Hardjo podem ocorrer em qualquer fase da gestação, além aumentar as perdas embrionárias e, conseqüentemente, ao aumento do número de doses de sêmen utilizadas por prenhez (FAINE, 1982; ELLIS, 1984; ELLIS et al., 1985). Os sinais clínicos da leptospirose em bovinos podem ser divididos em duas fases distintas: a aguda, que coincide com a leptospiremia e observada com maior frequência em rebanhos jovens e a crônica, de ocorrência mais tardia, e com sinais mais evidentes no trato genital causando falhas reprodutivas (ELLIS, 1984). Esta última fase, geralmente associada ao sorovar Hardjo genótipo Hardjobovis, pode resultar em abortamentos, natimortalidade, nascimento de bezerros debilitados e, raramente, mumificação fetal (DHALIWAL et al., 1996). A fase aguda em vacas leiteiras caracteriza-se por febre transitória e queda brusca na produção leiteira por um período de dois a dez dias. Esta manifestação é chamada "*milk drop syndrome*", na qual o leite apresenta consistência de colostro, com coágulos espessos de coloração amarelada e alta contagem de células somáticas. O úbere pode apresentar-se edematoso e flácido à palpação, com comprometimento dos quatro quartos, podendo ou não estar acompanhado de sinais clínicos, retornando ao normal em média duas semanas após o início das alterações, com ou sem tratamento. Estes sinais clínicos exacerbados ocorrem com maior frequência na infecção causada pelo sorovar Hardjo genótipo Hardjoprajtino ou outros sorovares não adaptados ao bovino (HIGGINS; HARBOUNE; LITTLE, 1980; PEARSON; MACKIE; ELLIS, 1980; BOLIN; ALT, 1999).

2.8 DIAGNÓSTICO

Devido à maioria dos sinais clínicos da leptospirose ser inespecíficos, o seu diagnóstico é difícil e depende de uma variedade de exames sorológicos, microbiológicos e moleculares para sua confirmação (LEVETT, 2001). A detecção de anticorpos específicos pode ser realizada através da SAM, de ensaios de hemaglutinação indireta (IHA) ou ensaios imunoenzimáticos (ELISA); já a bactéria e seus componentes podem ser detectados na urina ou tecidos por cultura, microscopia de campo escuro, imunocoloração e PCR (BHARTI et al., 2003; FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001).

O diagnóstico bacteriológico procura detectar o agente etiológico por métodos diretos através da observação em microscópio de campo escuro ou por coloração, isolamento do agente em meios de cultura específicos, imunofluorescência direta e imuno-

histoquímica. Entretanto, cada metodologia tem suas vantagens e desvantagens dependendo de sua praticidade e aplicabilidade (LEVETT, 2001).

As leptospiros são difíceis de serem coradas pelos métodos tradicionais, como o método de Gram, e suas dimensões reduzidas não são visualizadas por microscopia óptica convencional (AVELAR; PEREIRA, 2005). Entretanto, técnicas específicas como microscopia de campo escuro ou contraste de fase (FAINE, 1982), coloração por prata ou por conjugados imunocorados com fluoresceína ou imuno-histoquímica facilitam a sua visualização (ADLER; FAINE, 2005). O principal objetivo destes exames é a observação da morfologia e motilidade características das espiroquetas. Na Medicina Veterinária, o fluido mais utilizado é a urina onde as leptospiros podem ser observadas na segunda semana de infecção, ou em períodos posteriores, em casos de pacientes que são portadores renais. Porém, o exame direto da urina em microscopia de campo escuro tem baixa sensibilidade devido à eliminação intermitente da bactéria na urina, além de artefatos de técnica e outras estruturas presentes na amostra que podem ser confundidos com leptospiros (WHO, 2003). Outra desvantagem é o curto período entre a coleta da urina e a realização do exame, pois se o pH for ácido irá lisar as leptospiros gerando resultados falsos negativos (BOLIN; ZUENER; TRUEBA, 1989).

O isolamento da *Leptospira* spp. é considerado o diagnóstico definitivo da leptospirose e a partir da obtenção do seu cultivo é possível realizar a identificação do sorovar infectante (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). Entretanto, a cultura das leptospiros apresenta várias limitações, como a complexidade dos meios de cultura, a necessidade de semear o material imediatamente após a coleta, o longo tempo de geração da bactéria além da dificuldade em obter amostra livre de contaminantes (LILENBAUM, 1996). As culturas são incubadas a uma temperatura de 30°C e examinadas semanalmente por microscopia de campo escuro durante pelo menos 13 semanas. Amostras com possível contaminação podem ser inoculadas em meios de cultura seletivos contendo antibióticos (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001; ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). Na espécie bovina, as leptospiros foram isoladas principalmente em amostras de urina, rim, útero e produtos de abortamento de bovinos (ELLIS et al., 1982).

Dentre os métodos baseados na detecção de anticorpos anti-*Leptospira* alguns testes de ELISA foram desenvolvidos utilizando uma grande variedade de preparações antigênicas a partir de lipoproteínas recombinantes, como LipL32, LigA, ou de outras proteínas da membrana externa como OmpL1. No entanto, a sensibilidade e a especificidade

não coincidem com aqueles da SAM e a realização somente do ELISA não é recomendado (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

A SAM é o exame recomendado pela Organização Mundial de Saúde e o teste mais utilizado por pesquisadores de todo o mundo para o diagnóstico da leptospirose. É considerado o “padrão ouro” para o diagnóstico da leptospirose porque é incomparável a outros testes devido a sua alta especificidade (sorovar/sorogrupo), de acordo com *WORLD HEALTH ORGANIZATION – ILS* (2003). A técnica consiste na reação entre anticorpos presentes no soro do paciente com suspensões de antígenos vivos de sorovares. Após incubação são examinados microscopicamente para a observação da aglutinação e o resultado é apresentado em títulos de anticorpos (LEVETT, 2001). Para a correta interpretação deste teste deverão ser considerados tais fatores como: reações cruzadas entre sorovares, vacinação recente e o início da fase aguda da enfermidade (BOLIN, 1996). Entre as desvantagens desta técnica, pode ainda ser citada a falta de contribuição efetiva para o diagnóstico precoce, o alto custo de manutenção de uma bateria de leptospiras vivas, a necessidade de representantes de diversos sorogrupos e a realização de repiques semanais (RIBEIRO et al., 1996). O laboratório deve manter cepas circulantes da região, mas mesmo assim podem aparecer casos onde a infecção é causada por uma não circulante (WHO, 2003).

Portanto, em vista da necessidade do desenvolvimento de métodos que ofereçam maior sensibilidade, especificidade e rapidez, aumentou-se o uso de técnicas moleculares para a detecção de leptospiras (MAGAJEVSKI, 2002). De acordo com Anzai (2006), a PCR vem sendo utilizada de forma crescente para o diagnóstico precoce da leptospirose no homem e em diversas espécies animais, por ser um meio eficaz de diagnóstico antes do desenvolvimento do título do anticorpo ou quando os títulos estão baixos e o curso clínico confuso. A técnica de PCR apresenta alta sensibilidade e especificidade, permitindo amplificar quantidades mínimas de DNA do micro-organismo em diversos tipos de amostras biológicas, tais como soro, liquor, urina, fezes e tecidos (BAL et al., 1994). Uma das vantagens é a agilidade no diagnóstico de doenças agudas (SMYTHE et al., 2002) e uma alternativa para detecção de leptospiras em materiais de difícil isolamento, tais como o sêmen nas centrais de inseminação artificial (GOTTI, 2006). Para sua execução a PCR necessita de *primers* específicos que permitam a amplificação da maioria das cepas patogênicas ou potencialmente patogênicas (JOUGLARD, 2005). Vários pares de *primers* têm sido descritos, frequentemente baseados nos genes 16S ou 23S rRNA e em elementos de repetição em tandem da bactéria (LEVETT, 2001; HEINEMANN et al., 1999). No entanto, estes testes ainda estão sendo padronizados e não são aceitos como métodos de referência (LEVETT,

2001; BAJANI et al., 2003), pois apesar de serem altamente sensíveis e específicos, eles não têm sido sistematicamente comparados entre si e com a SAM (BAJANI et al., 2003).

A utilização da técnica de MLVA para a tipificação de leptospiras envolve a análise de múltiplos *loci* de VNTR, que são sequências repetidas de diferentes números de cópias geradas incorretamente durante a replicação do DNA da bactéria (VAN BELKUM et al., 1998). Este método consiste na amplificação destas regiões de comprimento variável, que mostram polimorfismo, diferenciando o número de cópias através do tamanho do fragmento amplificado resultante. Segundo Pavan et al (2011), esta é uma técnica simples e fácil de implementar em qualquer laboratório sem equipamento sofisticado, útil para a identificação de cepas dentro dos sorovares de *Leptospira* e ideal para os estudos epidemiológicos.

Cada um dos procedimentos de diagnóstico apresenta vantagens e desvantagens. Alguns dos ensaios sofrem com a perda de sensibilidade e outros com problemas de especificidade. Por esta razão, não há uma única técnica recomendada para uso em todas as situações clínicas. O uso de uma combinação de testes permite uma maior sensibilidade e especificidade no diagnóstico. (BOLIN, 2003; FAINE et al., 1999).

2.9 IDENTIFICAÇÃO E TIPIFICAÇÃO DE ISOLADOS

Nos estudos epidemiológicos, a identificação e tipificação do agente são imprescindíveis para montar um quadro real da leptospirose em determinada região, principalmente onde os casos de leptospirose apresentam títulos baixos na SAM para diferentes sorovares ou quando ocorre reações paradoxais onde são detectados títulos altos de sorogrupos não relacionados (POSTIC et al., 2000; LEVETT, 2001).

Embora seja amplamente difundida, a classificação sorológica de novos isolados em sorogrupos possui uma metodologia muito trabalhosa para sua execução, pois para sua realização é necessária a manutenção de um número elevado de cepas vivas e antissoros (FAINE et al., 1999). Outra técnica utilizada para a tipificação de cepas é o emprego de painéis de anticorpos monoclonais (TERPSTRA, 1992), que apesar de ser uma técnica de alto custo pode ser executada apenas no laboratório de referência Royal Tropical Institute na Holanda (SEIXAS NETO, 2012). Os hibridomas estáveis produzem por tempo indeterminado o anticorpo monoclonal desejado (KOHLENER; MILSTEIN, 1975), evitando assim o uso de um número elevado de animais como é o caso da produção de anticorpos policlonais.

Nas últimas três décadas, algumas técnicas moleculares foram desenvolvidas e empregadas na tipificação de isolados de leptospiras como, por exemplo, *pulsed field gel electrophoresis* (PFGE) (HERRMANN et al., 1992), *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) *analysis* (ZUERNER et al., 1993), *insertion sequences bacterial typing methods* (IS) (ZUERNER et al., 1995), *multilocus variable-number tandem-repeat analysis* (MLVA) (MAJED et al., 2005), sequenciamento *rrs* (CERQUEIRA et al., 2010), sequenciamento de genes específicos ou gene incluindo fragmentos *rpoB* (LA et al., 2006), *gyrB* (SLACK et al., 2006), *sec Y* (VICTORIA et al., 2008), *ligB* (CERQUEIRA et al., 2009) e *multiple locus sequence typing* (MLST) (AHMED et al., 2006; LEON et al., 2010).

A heterogeneidade genômica dos genótipos agrupados no sorovar Hardjo foi primeiro demonstrado usando *restriction enzyme analysis* (REA) (ROBINSON et al., 1982), e delimitou dois genótipos: Hardjobovis e Hardjoprajitno (RAMADASS; MARSHALL, 1990). O genótipo Hardjobovis pertence à espécie *L. borgpetersenii* e o Hardjoprajitno à espécie *L. interrogans*. Essas duas espécies são as principais causadoras de leptospirose tanto em animais de produção como nos seres humanos, desta forma, vários estudos utilizando técnicas de biologia molecular estão sendo realizados para entender melhor as diferenças epidemiológicas, biológicas e moleculares (CHIARELI et al., 2012).

Bulach et al. (2006), estudaram o genoma completo das sequências de duas cepas de *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo (L550 and JB197) e concluíram que a presença de mutações que levam a trocas de aminoácidos não conservados podem ser responsáveis pela existência das diferenças fenotípicas e de virulência observadas nestas duas cepas.

Em comparação com a *L. interrogans*, a *L. borgpetersenii* além de possuir um genoma menor também perdeu função de genes relacionados à capacidade de sobrevivência no meio ambiente, transporte e utilização de metabólitos. Os autores concluíram que a evolução da *L. borgpetersenii* está em direção da dependência estrita de ciclo de transmissão hospedeiro-hospedeiro, pois enquanto a *L. interrogans* sobrevive até 200 dias em condições ideais de água doce e solo úmido, a *L. borgpetersenii* não tolera escassez de nutrientes e tem ciclo de transmissão limitado a hospedeiro-hospedeiro. Portanto, apesar dos dois genótipos do sorovar Hardjo causarem problemas reprodutivos em bovinos, eles são epidemiologicamente muito diferentes (BULACH et al., 2006).

Apesar dos sinais clínicos causados por ambos os genótipos do sorovar Hardjo serem muito parecidos, a infecção causada pelo sorovar Hardjo genótipo Hardjobovis é frequentemente caracterizada pela forma crônica (ocasionando aborto), enquanto que o sorovar Hardjo genótipo Hardjoprajitno, caracteriza-se por ser mais patogênica levando a

queda na produção de leite e também problemas reprodutivos (ELLIS, 1994). Koizumi e Yasutomi (2012) mostraram que a taxa de aborto na infecção pelo sorovar Hardjo genótipo Hardjobovis é de 3-10% e quando a infecção é pelo sorovar Hardjo genótipo Hardjoprajitno a taxa aumenta para 30%. Estudos sobre o locus *rfb* da biossíntese do LPS sugeriram que o genótipo Hardjoprajitno evoluiu de um ancestral comum da *L. interrogans* sorovar Copenhageni que ao longo da evolução adquiriu genes *rfb* do genótipo Hardjobovis, permitindo que esse ancestral se adaptasse de alguma maneira ao hospedeiro bovino, dando origem assim ao genótipo Hardjoprajitno (DE LA PEÑA-MOCTEZUMA et al., 1999).

Em 1991, em Minas Gerais, ocorreu o primeiro isolamento do sorovar Hardjo genótipo Hardjoprajitno no Brasil (MOREIRA, 1994). Desde então, a cepa nomeada Norma vem sendo utilizada em estudos sorológicos no Brasil, detectando um maior número de animais positivos em comparação com a cepa de referência (Hardjoprajitno) (MOREIRA, 1994; HERRMANN et al., 2004; ARAÚJO et al., 2005; LAGE et al., 2007;). Estas diferenças encontradas são provavelmente devido ao baixo número de passagens e origem da amostra Norma. Isolada em 1991, a amostra Norma tem um menor número de passagens “in-vitro” que a amostra Hardjoprajitno (RODRIGUES et al., 2011) isolada em 1938 (WOLF, 1969).

2.10 CONTROLE E PREVENÇÃO

Com relação ao controle da leptospirose no rebanho, devem ser aplicadas medidas em cada um dos componentes da cadeia de transmissão, tais como: fazer a identificação precisa dos sorovares prevalentes na propriedade; detectar a fonte de infecção e os animais infectados; realizar imunoprofilaxia e antibioticoterapia nos animais portadores e doentes e realizar a vigilância epidemiológica dos doadores de sêmen. O controle sanitário dos animais incorporados aos rebanhos, o saneamento do meio através da higiene e desinfecção das instalações e equipamentos, armazenamento dos alimentos volumosos e concentrados, drenagem e destino adequado de excretas, cadáveres e restos de animais também são considerados de grande importância para a prevenção da leptospirose (FAINE, 1982; ELLIS, 1984; LILENBAUM, 1996).

Em infecções acidentais, ocasionadas por sorovares não mantidos pelos bovinos, devem-se identificar quais são os animais reservatórios e como está ocorrendo o contato entre eles e os bovinos. No entanto, quando a infecção é determinada pelo sorovar Hardjo, cuja principal fonte de infecção é o próprio bovino infectado, deve-se proibir a introdução de novos animais no rebanho, exceto aqueles negativos no sorodiagnóstico, tratar

os animais reagentes e aumentar a imunidade utilizando vacinas que contenham sorovares presentes na região (HASHIMOTO et al., 2012), incluindo se possível, cepas locais (FAINE et al. 1999).

O tratamento das fontes de infecção deve ser realizado com estreptomicina ou diidroestreptomicina para reduzir o potencial de transmissibilidade, visando eliminar o estado de portador e impedindo a eliminação de leptospiras através da urina, sêmen e secreção vaginal. Entretanto, o custo do tratamento é elevado e realizado apenas quando se tem uma justificativa econômica (FAINE et al., 1999).

2.11 VACINAS

A vacinação é uma importante ação preventiva contra a infecção dos animais por leptospiras, para esse fim, vacinas inativadas são as mais utilizadas (DELLAGOSTIN et al., 2011). Porém, a resposta imune desencadeada a partir dessas preparações é ativada, principalmente, pela porção polissacarídica dos LPSs das bactérias. Esses antígenos estimulam uma resposta timo independente, não induzindo, portanto, proteção a longo prazo contra infecção o que torna necessária sua administração anual ou semestral (BOLIN; ZUERNER; TRUEBA, 1989).

A vacinação contra a leptospirose bovina apresenta sérias limitações, pois as preparações vacinais disponíveis são bacterinas, as quais são sorovar-específica com proteção apenas para os sorovares presentes na vacina (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009). Outro dado importante relacionado à vacinação de bovinos é que vacinas que utilizam *L. interrogans* Hardjoprajitno induzem a uma resposta humoral, enquanto as vacinas que utilizam *L. borgpetersenii* Hardjobovis induzem a uma resposta celular (NAIMAN et al., 2002). Além disso, essas vacinas disponíveis comercialmente são constituídas por cepas isoladas em outros países do mundo, com fauna e ecossistemas diferentes das existentes em nosso país (LILENBAUM, 1996).

A diversidade antigênica observada entre os sorovares de *Leptospira* deve-se às variações de carboidratos na cadeia lateral do LPS, dificultando a elaboração de uma vacina de LPSs multivalente, por isso, a identificação e o conhecimento da expressão de proteínas antigênicas durante a infecção pode ser uma ferramenta importante no desenvolvimento de vacinas. Atualmente, diversos grupos de pesquisa estão concentrados na identificação de proteínas relacionadas à patogenicidade ou virulência, e que tenham um amplo espectro de conservação dentre os principais sorovares patogênicos, para a elaboração

de uma vacina protéica eficaz e que confira proteção a longo prazo (HAAKE et al, 1999; GAMBERINI et al., 2005).

Neste contexto, as proteínas de membrana externa das leptospiros têm sido os maiores alvos para o desenvolvimento de vacinas. As OMPs (*outer membrane proteins* - proteínas de membrana externa), expostas na superfície das leptospiros são consideradas como potenciais imunógenos (ZUERNER et al., 2000). Palaniappan et al. (2002) descreveram uma nova família de proteínas (Ligs) e mostraram seu potencial no desenvolvimento de vacinas recombinantes contra leptospirose, pois foram consideradas proteínas de membrana externa presentes em todos os sorovares de leptospiros patogênicas e a expressão destas proteínas ocorre somente durante a infecção (MATSUNAGA et al., 2003; KOIZUMI; WATANABE, 2005).

Lipoproteínas de espiroquetas têm sido consideradas antígenos capazes de induzir resposta imune protetora (HAAKE, 2000), confirmando a sua importância na patogênese das leptospiros. Nestes micro-organismos, as lipoproteínas são comprovadamente, as mais importantes proteínas que compõem a membrana celular, entretanto, o número de lipoproteínas de superfície celular de *Leptospira* caracterizadas ainda é pequeno (SHANG; SUMMERS; HAAKE, 1996; HAAKE et al., 1998; HAAKE et al., 2000; CULLEN et al., 2003). Atualmente, a principal proteína de membrana relatada é a LipL32, sua sequência e a expressão é altamente conservada entre espécies de leptospiros patogênicas e está ausente na membrana externa de leptospiros não patogênicas. Vários trabalhos têm indicado a proteína LipL32 como forte candidata para o desenvolvimento de uma vacina contra a leptospirose (HAAKE et al., 2000; LAFETÁ, 2010).

REFERÊNCIAS

- ACHA, P. N; SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedadpiroses transmisibles comunes al hombre y a los animales. **Panamericana de la Salud**, Washington: Publicação científica, 503, v.1, 398 p, 2003.
- ADLER, B. et al. Development of an improved selective medium for isolation of leptospire from clinical material. **Veterinary Microbiology**, v.12, p.377-381, 1986.
- ADLER, B; FAINE, S. The Genus Leptospira. **The Prokaryotes**. 3^a. Ed, 2005.
- ADLER, B; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. Leptospira and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v.140, n.3-4, p.287–296, 2010.
- AHMED, N. et al. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic Leptospira species. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v.5, p.28, 2006.
- ALVES C. J; VASCONCELLOS S. A; CAMARGO Z. M. D. M. Influencia de fatores ambientais sobre a proporção de caprinos soro reatores para a leptospirose em cinco centros de criação do estado da Paraíba, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.63, p.11-18, 1996.
- ANZAI, E. K. **Utilização da PCR para o Diagnóstico da Leptospirose em Cães naturalmente infectados por Leptospira spp.** Londrina: UEL, 2006. 48 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.
- ARAÚJO, V.E.M. et al. Frequência de aglutininas anti-Leptospira interrogans em soros sanguíneos de bovinos, em Minas Gerais, de 1980 a 2002. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.4, p.430-435, 2005.
- AVELAR K. E. S; PEREIRA M. M. Espiroquetídeos. **In: Trabulsi L. R & Alterthum F. Microbiologia**, 4^a. ed Editora Atheneu, São Paulo, p. 399-408, 2005.
- BAJANI, M.D. et al. Evaluation of four commercially available rapid serologic tests for diagnosis of leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.803–809, 2003.
- BAL, A. E. et al. Detection of leptospire in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 8, p. 1894-1898, 1994.
- BARANTON, G. DNA. Relatedness of serovars. **Prepublication list. Unité de Bactériologie Moléculaire et Médicale, Institut Pasteur**. Leptospira Molecular Biology Home Page (<http://www.pateur.fr/bionleptospira>). 1998.
- BARCELLOS, C. et al. Spatial distribution of leptospirosis in Rio Grande do Sul, Brazil: recovering the ecology of ecological studies. **Cadernos de Saúde Pública**, v.19, p.1283-1292, 2003.

- BATISTA, C. S. A. et al. Soroprevalência de leptospirose em cães errantes da cidade de Patos, Estado da Paraíba, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 41, n. 2, p. 131-136, 2004.
- BEER, J. **Doenças infecciosas em animais domésticos**. 2. ed. São Paulo: Roca, 380 p, 1999.
- BHARTI, A. R. et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infection Disease**, v.3, p.757-771, 2003.
- BOLIN, C.A; ZUENER, R.L; TRUEBA, G. Comparisson of three techniques to detect *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjo-bovis in bovine urine. **American Journal of Veterinary Research**, v.50, n.7, p. 1001-1003, 1989.
- BOLIN, C. A. Diagnosis of leptospirosis: A reemerging diseases of companion animas. **Seminars in veterinary medicine and surgery (small animal)**, v.11, n.3, p.166-171, 1996.
- BOLIN, C. A; ALT, D. P. **The Bovine Practitioner**, Stillwater, n. 33, p. 50-55, 1999.
- BOLIN, C. A. Diagnosis and control of bovine leptospirosis. In: WESTERN DAIRY MANAGEMENT CONFERENCE, 6., Reno. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Reno, p. 155-160, 2003.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de leptospirose**. Brasília:, 98 p. 1995.
- BRENNER, D. J. et al. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.49 n.2, p.839-858, 1999.
- BULACH, D.M. et al. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, U. S. A, v.103, p.14560–14565, 2006.
- CASTRO, V. et al. Soroprevalência da leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo**, v75, n.1, p.3-11, 2008.
- CERQUEIRA, G.M. et al. Distribution of the leptospiral immunoglobulin-like (lig) genes in pathogenic *Leptospira* species and application of ligB to typing leptospiral isolates. **Journal of Medical Microbiology**, v.58, p.1173–1181, 2009.
- CERQUEIRA, G.M. et al. Monitoring *Leptospira* strain collections: the need for quality control. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.82, p.83–87, 2010.
- CERVANTES, L.P.M. et al. Estudio serológico de leptospirosis bovina en México. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v.54, n.1, p.24-27, 2002.
- CHIARELI, Denise et al . Controle da leptospirose em bovinos de leite com vacina autógena em Santo Antônio do Monte, Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 7, p. 633-639, July, 2012 .

- CULLEN, P. A. et al. LipL21 is a novel surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. **Infection and Immunity**, v.71, n.5, p.2414-2421, 2003.
- CUMBERLAND, P; EVERARD, C.O; LEVETT P.N. Assessment of the efficacy of an IgM-elisa and microscopic agglutination test (MAT) in the diagnosis of acute leptospirosis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygien**, v.61, p.731-734, 1999.
- DELLAGOSTIN, O. A. et al. Recombinant vaccines against Leptospirosis. **Human Vaccines**, v.7, n.11, p.1215-1224, 2011.
- DE LA PEÑA-MOCTEZUMA, A. et al . Comparative analysis of the LPS biosynthetic loci of the genetic subtypes of serovar Hardjo: *Leptospira interrogans* subtype Hardjoprajitno and *Leptospira borgpetersenii* subtype Hardjobovis. **FEMS Microbiology Letters**, v.177, p.319-326, 1999
- DHALIWAL, G.S; MURRAY, R.D; ELLIS, W.A. Reproductive performance of dairy herds infected with *Leptospira interrogans* serovar Hardjo relative to the year of diagnosis. **Veterinary Record**, v.138, p. 272-276, 1996.
- ELLIS, W.A. et al. Bovine leptospirosis: Serological findings in aborting cows. **Veterinary Record**, v.110, p.178-180, 1982.
- ELLIS, W.A. Bovine leptospirosis in the tropics: prevalence, pathogenesis and control. **Preventive Veterinary Medicine**, v.2, p.411-421, 1984.
- ELLIS, W.A. et al. Excretion of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo following calving or abortion. **Research Veterinary Science**, v.39, p. 296-298, 1985.
- ELLIS, W. A. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.10, p.463-478, 1994.
- ELLIS, W. A. International Committee on Systematic Bacteriology. Subcommittee on the Taxonomy of *Leptospira*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington D.C., v. 45, p.872-4. 1995.
- ELLINGHAUSEN, H. C. JR; MCCULLOUGH, W. G. Nutrition of *Leptospira pomona* and growth of 13 other serotypes: fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80. **American Journal of Veterinary Research**, v.26, p.45-51, 1965.
- FAINE, S. Guidelines for the control of leptospirosis. **World Health Organization Offset Publication**[67]. Geneva. 1982.
- FAINE S. *Leptospira and leptospirosis*. **CRC Press**, Boca Raton, Fla.USA, 1994.
- FAINE, S. et al. *Leptospira and Leptospirosis*. 2nd ed. **Medi Science**, Melbourne. 272p, 1999.
- FAVERO, A. C. M. et al. Leptospirose bovina: variantes sorológicas predominantes em colheitas efetuadas no período de 1984 a 1997 em rebanhos de 21 estados do Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 68, n. 2, p. 29-35, jul.-dez. 2001

FERESU, S.B. et al. Identification of a serogroup bataviae *Leptospira* strain isolated from an ox in Zimbabwe. **Zentralblatt fur Bakteriologie**, v.289, p.19-29, 1999.

FIGUEIREDO, A.O. et al. Prevalência e fatores de risco para a leptospirose em bovinos de Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n.5, p.375-381, 2009.

FREITAS, D.C. Identificação da leptospirose bovina no Brasil. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária da USP**, v.16, n.1, p. 81-83, 1957.

GAMBERINI, M. et al. Whole-genome analysis of *Leptospira interrogans* to identify potential vaccine candidates against leptospirosis. **FEMS Microbiology Letters**, v.15, p.305-313, 2005.

GOTTI, T.B. **Avaliação de três protocolos de associações antibióticas na qualidade do sêmen bovino quanto ao seu efeito sobre a microbiota autóctone e na destruição da *Leptospira* spp. sorovares Hardjo (estirpes Hardjoprajitno e Hardjobovis) e Wolffi (estirpe 3705). 88f.** Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2006.

GREENE, C. E.; SYKES, J. E.; BROWN, C. A.; HARTMAN, K. Leptospirosis. In: GREENE, C. E. (Ed.). *Infectious diseases of the dog and cat*. **St. Louis: Elsevier**, p. 402-417, 2006.

HAAKE, D. A. et al. Characterization of leptospiral outer membrane lipoprotein LipL36: downregulation associated with late-log-phase growth and mammalian infection. **Infection and Immunity**, v.66, n.4, p.1579-1587, 1998.

HAAKE, D.A. et al. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. **Infection and Immunity**, v.67, p.6572-6582, 1999.

HAAKE, D. A. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. **Microbiology**, v.146, p.1491-1504, 2000.

HAAKE, D. A. et al. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. **Infection and Immunity**, v.68, n.4, p.2276-2285, 2000.

HANSON, L. E. Leptospirosis in domestic animals: the public health perspective. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 181, n. 12, p. 1505-1509, 1982.

HASHIMOTO V.L. **Clonagem e expressão gênica de antígenos candidatos vacinais contra leptospirose.** [Tese (Doutorado em Biotecnologia)] – São Paulo – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de Paulo, 2012.

HASHIMOTO, V.Y. et al. Prevalência e fatores de risco associados á *Leptospira* spp. em rebanhos bovinos da região centro-sul do estado do Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, p.99–105, 2012.

HATHAWAY, S.C.; LITTLE, T.W.A.; PRITCHARD, D.G. Problems associated with the serological diagnosis of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo infection in bovine populations. **Veterinary Record**, v.26, p.85-86, 1986.

HEINEMANN, M.B. et al. Detection of leptospiras in bovine semen by polymerase chain reaction. **Australian Veterinary Journal**, v.77, p.32-34, 1999.

HERRMANN, J.L. et al. Pulsed-field gel electrophoresis of NotI digests of leptospiral DNA: a new rapid method of serovar identification. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, p.1696–1702, 1992

HERRMANN, G.P. et al. Soroprevalência de aglutininas anti-*Leptospira* spp. em ovinos nas Mesorregiões Sudeste e Sudoeste do Estado Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v.34, n.2, p.443-448, 2004.

HIGGINS, R. J.; HARBOUNE, J. F.; LITTLE, T. W. A. Mastitis and abortion in dairy cattle associated with leptospira of the serotype *hardjo*. **The Veterinary Record**, London, n. 27, p. 307-310, 1980.

JOHNSON, R. C; HARRIS, V. G. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospiras. I. Growth at low temperatures. **Journal of Bacteriology**, 94, 27-31, 1967.

JOHNSON, R. C; FAINE, S. *Leptospira*. In: **Bergey's manual of systematic bacteriology** (eds. N.R.Krieg & J.G.Holt), Williams & Wilkins, Baltimore, Md, 1984, vol. 1, p.62-.67.

JOUGLARD, S. D. D. Diagnóstico de leptospirose por PCR e caracterização de isolados de leptospira spp. por seqüenciamento do 16s rDNA e análise de VNTR. 2005. Nested polymerase chain reaction for detection of pathogenic leptospiras. **Canadian Journal of Microbiology**, v.52, p.747-752, 2005.

KO, A.I; GOARANT, C; PICARDEAU, M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 10, p. 736-747, 2009.

KOHLER, G; MILSTEIN, C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of pre-defined specificity. **Nature**, p. 256 – 495, 1975.

KOIZUMI, N; WATANABE, H. Leptospirosis Vaccines: Past, Present, and Future. **Journal of Postgraduate Medical**, v.51, p.210-214, 2005.

KOIZUMI, N; YASUTOMI, I. Prevalence of leptospirosis in farm animals. **Japanese Journal of Veterinary Research**, v.60, p.55–58, 2012

LA, S.B. et al. Partial rpoB gene sequencing for identification of *Leptospira* species. **FEMS Microbiology Letters**, v.263, p.142–147, 2006.

LAFETÁ, B. N. **Produção e caracterização da proteína recombinante LipL32 de *Leptospira* spp.** 2010. 45 folhas. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

LAGE, A.P. et al. Serology for *Leptospira* sp. in cattle of the state of Paraíba, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.74, n.3, p.185-190, 2007.

LEON, A. et al. Multilocus sequence analysis for typing *Leptospira interrogans* and *Leptospira kirschneri*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, p.581–585, 2010.

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

LEVETT, P. N; SMYTHE, L. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.64, p.1071–1072, 2014.
<<http://www.med.monash.edu.au/microbiology/staff/adler/tsc-2013-minutes.pdf>> Acesso em: 02 de janeiro de 2016

LILENBAUM, W; SANTOS, M.R.C. Leptospirosis in animal reproduction: III. Role of the Hardjo serovar in bovine leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Latino americana de Microbiologia**, v.37, n.2, p.87-92, 1995.

LILENBAUM, W. Bovine Leptospirosis in Brazil: A Review, **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v.18, n.1, p.9-13, 1996.

LILENBAUM, W; MARTINS, G. Leptospirosis in cattle: a challenging scenario for the understanding of the epidemiology. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.61 Suppl 1, p.63–68, 2014

MAGAJEVSKI, F. **Avaliação da reação em cadeia da polimerase (PCR) na detecção de *Leptospira interrogans* sorovar *hardjo* em sêmen e urina de touros (*Bos taurus*) sorologicamente reagentes. 2002. 65 f.** Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, 2002.

MAJED, Z. et al. Identification of variable-number tandem-repeat loci in *Leptospira interrogans* sensu stricto. **Journal of Clinical Microbiology**, v43, p.539–545, 2005.

MANUAL DE LEPTOSPIROSE. Fundação Nacional de Saúde. 3. ed. **Brasília: Gerência Técnica de Editoração**, v.2, p.7-89, 1997.

MATHEWS, K.A.; MONTEITH, G. Evaluation of adding diltiazem therapy to standard treatment of acute renal failure caused by leptospirosis: 18 dogs (1998-2001). **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v.17, n.2, p.149-158, 2007.

MATSUNAGA, J. et al. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. **Molecular Microbiology**, v.49, n.4, p.929-945, 2003.

MIKHIN NA, AZINOV SA. Spirochaetal jaundice of cattle in North Caucasus. **Sovyet Veterinary**, v.10: 23-27, 1935 (artículo original inexistente, un resumen en: **Vet Bull** 1937; 7:419).

MOREIRA, E.C. **Avaliação de métodos para erradicação de leptospiroses em bovinos leiteiros. Minas Gerais, Brasil. 1994. 94p.** Tese de Doutorado em Medicina Veterinária

Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1994.

MYYERS, D.M. Manual de métodos para El diagnóstico de laboratorio de La leptospirosis. **Martinez: OPAS, Centro Panamericano de Zoonosis**, 1985.

NAIMAN, B.M. et al. Evaluation of type 1 immune response in naive and vaccinated animals following challenge with *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo: involvement of WC1+ $\gamma\delta$ and CD4 T cells. **Infection and Immunity**, v.70, p. 6147–6157, 2002.

NASCIMENTO, A.L. et al. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. **Journal of Bacteriology**, v.186(7), p.2164-72, 2004.

OLIVEIRA, F.C.S. et al. Soroprevalência de leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no estado da Bahia. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.76, n.4, p.539-546, 2009.

PALANIAPPAN, R.U. et al. Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA protein of *Leptospira interrogans*. **Infection and Immunity**, v.70, p.5924-5930, 2002.

PARTE, Aidan C. Genus *Leptospira*. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/leptospira.html>>. Acesso em: 02 de janeiro de 2016.

PAVAN, M.E. et al. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of reference strains used for the diagnosis of leptospirosis in Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**, v.43, p.251-255, 2011

PEARSON, J. K. L; MACKIE, D. P; ELLIS, W. A. Milk drop syndrome resulting from *Leptospira hardjo*. **The Veterinary Record**, London, v.107, p. 135-137, 1980.

PICARDEAU, M. et al. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. **PLoS One**, v.3(2), e1607, 2008.

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

POSTIC D. et al. Interest of partial 16S rDNA gene sequences to resolve heterogeneities between *Leptospira* collections: application to *L. meyeri*. **Research in Microbiology**, v.151, p.333-341, 2000.

QUINN, P.J; CARTER, M.E; MARKEY, B.K. **Clinical Veterinary Microbiology**. London, Wolfe, 648p, 1994.

RADOSTITS, O.M; GAY, C.C; BLOOD, D.C; HINCHCLIFF, K.W. **Clínica Veterinária**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, p. 874-887, 2002.

RAMADASS, P; MARSHALL, R.B. Species differentiation of *Leptospira interrogans* serovar hardjo strain Hardjobovis from strain Hardjoprajitno by DNA slot blot hybridisation. **Research in Veterinary Science**, v.49, p.194-197, 1990.

RIBEIRO, M.A; BRANDAO, A.P; ROMERO, E.C. Evaluation of diagnostic tests for human leptospirosis. **Brazilian Journal Of Medical and Biological Research**, v.29, p.773-777, 1996.

ROBINSON, A. J. et al. Differentiation of subtypes within *Leptospira interrogans* serovars hardjo, balcanica and tarassovi by bacterial restriction-endonuclease DNA analysis (BRENDA). **Journal of Medical Microbiology**, v.15, p.331-338, 1982.

RODRIGUES, R. O. et al . Caracterização das proteínas de superfície de membrana externa da sorovariedade Hardjo isolada de bovinos em Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro , v. 31, n. 7, p. 555-560, 2011.

SALAÜN, L. et al. Application of multilocus variable-number tandem-repeat analysis for molecular typing of the agent of leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, p.3954–3962, 2006.

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

SHANG, E.S.; SUMMERS, T.A.; HAAKE, D.A. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding LipL41, a surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. **Infection and Immunity**, v.64, n.6, p.2322-2330, 1996.

SILVA J. F. P. Leptospirose. **Revista Acadêmica de Medicina**, v.3, p.39-44, 1998.

SILVA, F J. et al . Prevalência e fatores de risco de leptospirose bovina no Estado do Maranhão. **Pesquisa. Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro , v. 32, n. 4, p. 303-312, 2012.

SLACK, A.T. et al. Identification of pathogenic *Leptospira* species by conventional or real-time PCR and sequencing of the DNA gyrase subunit B encoding gene. **BMC Microbiology**, v.6, 95, 2006.

SMYTHE, L.D. et al. A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. **BMC Infectious Diseases**, v.2, 13, 2002

SOBOLEVA, G. L. Preparation and use of solid culture medium for *Leptospira* isolation. **Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii**, v.2, p.80-84, 1983.

SUGUNAN, A.P; VIJAYACHARI, P; SEHGAL, S.C. Evaluation of microscopic agglutination test as a diagnostic tool during acute stage of leptospirosis in high and low endemic areas. **Indian Journal of Medical Research**, v.114, p.99-106, 2001

TERPSTRA, W.J. Typing leptospira from the perspective of a reference laboratory. **Acta Leidensia**, v.60, n.2, p.79-87, 1992.

TURNER L. H. Leptospirosis III: Maintenance, isolation and demonstration of leptospirae. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.64, p.623-646, 1970.

VAN BELKUM, A. et al. Short- sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p.275-293, 1998.

VIEIRA, M.L. **Análise da expressão de proteínas de *Leptospira interrogans* virulentas e avirulentas pela proteômica.** 2008. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil, 2008.

VICTORIA, B. et al. Conservation of the S10-spc-alpha locus within otherwise highly plastic genomes provides phylogenetic insight into the genus *Leptospira*. **PLoS One** 3, e2752, 2008.

WOLFF, J.W. History of *Leptospira hardjo*. **American Journal of Veterinary Research**, v.30, p.485, 1969.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – ILS. *WHO*. Human leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control. **World Health Organization**, 2003.

XUE, F; YAN, J; PICARDEAU, M. Evolution and pathogenesis of *Leptospira* spp.: lessons learned from the genomes. **Microbes and Infection**.v.11(3), p.328-333, 2009.

YANAGAWA, R; KAWASHIMA, H; HIROTA, E. Studies on the bovine leptospirosis in Japan. I. Epizootiological investigations. **Expl. Rep. Govt. Exp. Stn. Anim. Hyg.**, v. 29, p. 261-275, 1955.

YASUDA , P.H.; STEIGERWALT, A.G.; SULZER, K.R. Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiracea with proposals for seven new *Leptospira* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.37, p. 407-415, 1987.

ZUERNER, R.L. et al. Restriction fragment length polymorphisms distinguish *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo type hardjo-bovis isolates from different geographical locations. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, p.578–583, 1993.

ZUERNER, R.L; ALT, D; BOLIN, C.A. IS1533-based PCR assay for identification of *Leptospira interrogans* sensu lato serovars. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, p.3284–3289, 1995.

ZUERNER, R. et al. Technological Advances in the Molecular Biology of *Leptospira*. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v.2, p.455-462, 2000.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Isolar leptospiros pertencentes ao sorovar Hardjo de amostras de urina de bovinos leiteiros naturalmente infectados do estado do Paraná.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Utilizar técnicas moleculares para identificação e caracterização dos isolados de leptospiros.
 - Caracterizar os isolados em nível de sorovar a partir da análise por MLVA;
 - Sequenciar e realizar análise filogenética do gene *sec Y* das amostras isoladas.

○ 4 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

4.1 ISOLATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *LEPTOSPIRA BORGPIETERSENII* SEROVAR HARDJO STRAIN HARDJOBOWIS IN THE URINE OF NATURALLY INFECTED CATTLE IN BRAZIL.

Artigo aceito para publicação no periódico **Genetics and Molecular Research (GMR)**, FUNPEC-RP (Ribeirão Preto Foundation for Research).

ABSTRACT

Most epidemiologic studies on bovine leptospirosis are based on serological tests that use antibodies against several serotypes, including the serovar Hardjo, which is widespread and considered to be the most adapted to bovine hosts. However, using only serological studies is not sufficient to identify and distinguish species of leptospires. The aim of this study was report the first isolation in Brazil of two strains serovar Hardjo obtained in urine samples from naturally infected cows in a small Brazilian dairy herd, find the genetic species and consequently the type strain Hardjobovis by molecular characterization. Fifteen dairy cows with a history of reproductive failure, such as abortion and infertility, were selected. Urine samples obtained from each animal were immediately seeded in tubes containing Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) culture medium. The identification of the isolates was performed by Multilocus variable-number tandem-repeat (VNTR) analysis (MLVA) technique and phylogenetic analysis of partial sequence of gene *sec Y*. From the 15 urine samples evaluated, two *Leptospira* were found and identified as the Londrina 49 and Londrina 54 strains. The MLVA profiles and sequencing of gene *sec Y* characterized the isolates as *L. borgpetersenii* serovar Hardjo strain Hadjobovis because it has different genetic pattern of *L. interrogans* serovar Hardjo strain Hardjoprajitno. Therefore, more studies are needed including isolation and molecular characterization from regional strains to obtain a better knowledge about epidemiology of serovar Hardjo in bovine which may assist in future strategies of prevention and control of bovine leptospirosis.

Key words: Bovine leptospirosis. MLVA. Diagnosis. Bacterial culture

INTRODUCTION

The infection caused by bacteria from the genus *Leptospira* is considered one of the major reproductive infectious disease in cattle worldwide (Adler and de la Peña Moctezuma, 2010). In Brazil, the infection is widespread in dairy and beef cattle herds (Favero et al., 2001; Hashimoto et al., 2012). Leptospirosis causes economic losses that are mainly associated with reproductive failure (abortion, infertility and embryonic death), decreased milk production and indirect costs of treatment (Ellis, 1994).

Despite its relevance in animal health, leptospirosis in cattle must still be studied further, particularly its etiology and epidemiology and the prevention and control of its infection (Lilenbaum and Martins, 2014). Most epidemiologic studies on bovine leptospirosis are based

on serological tests that identify antibodies against several serotypes (Faine et al., 1999), including serovar Hardjo which is widespread and considered to be the most adapted to bovine hosts (Ellis, 1994).

However, using only serological studies to determine serovars prevalence is not sufficient to identify and distinguish the species of leptospire that are found in a particular host. Currently, large variability with respect to species and genotypes circulating in cattle has been reported in molecular studies (Hamond et al., 2015a). The species *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo strain Hardjobovis (Salgado et al., 2014), as well as *Leptospira interrogans* serovar Hardjo strain Hardjoprajitno (Rinehart et al., 2012), is considered to be well adapted to cattle. Consequently, it appears that cattle worldwide are most commonly infected with the strain Hardjobovis because they are its natural host (Hanson, 1982).

Multilocus variable-number tandem-repeat (VNTR) analysis (MLVA) is a molecular technique that identifies DNA from many pathogenic bacterial species (Lindstedt, 2005) and has been used for typing different serovars (Salaün et al., 2006) and strains (Majed et al., 2005) of the genus *Leptospira*. Therefore, it may be a powerful methodology that contributes to epidemiological leptospirosis data (Slack et al., 2006). Together with MLVA, the partial sequencing of the gene *sec Y* is also effective in the molecular characterization of some species from the genus *Leptospira* (Ahmed et al., 2006).

Once the strategies to prevent and control leptospirosis infections are directly related to knowledge of circulating strains in a specific host and region, bacterial isolation and correct identification from genetic characterization will prove extremely important for understanding the etiology, epidemiology and pathogenesis of different leptospire species (Lilenbaum and Martins, 2014). Therefore, more studies with regional isolated strains are needed to fill these gaps.

Thus, the aim of this study was perform the molecular characterization (in the genetic species and type strain) of two strains of *Leptospira* belonging to serovar Hardjo isolated from naturally infected dairy cows. In this work, we report the first isolation in Brazil and Latin America of *L. borgpetersenii* serovar Hardjo strain Hardjobovis confirmed by MLVA and phylogeny of gene *sec Y*.

MATERIALS AND METHODS

Selection of animals

Fifteen dairy cows with a history of reproductive failure, such as abortion and infertility, were selected for this study. The cows were from five small farms located in the northwest of Parana State, Brazil. The microscopic agglutination test (MAT), which was undertaken approximately 15 days prior to urine sample collection, showed titers of leptospira antibodies between 400 and 1600 for the serovar Hardjo for these animals (Faine et al., 1999).

Urine collection and seeding

A urine sample from each animal was obtained during a perineal massage and was immediately seeded in tubes containing Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) culture medium (Difco - USA) with the following antibiotics: 5-fluorouracil (400 mg / L; Sigma ® -USA), chloramphenicol (5 mg / L; Sigma ® -USA), nalidixic acid (50 mg / L; INLAB®-BR), neomycin (10 mg / L; Sigma ® -USA) and vancomycin (10 mg / L; Acros ® -USA) (Zacarias et al., 2008). After incubation at 28°C for 24 hours, the cultures were seeded in duplicate using the same medium (but without antibiotics) and these tubes were evaluated weekly for six months with a dark field microscope (Olympus BX40 Model).

Extraction and Amplification of DNA

For genetic characterization, DNA from leptospire cultures was extracted using the PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen - USA). DNA from the leptospire strain isolates was amplified using the Platinum PCR SuperMix Kit (Invitrogen - USA) according to the following conditions: 45 µL of each reaction containing SuperMix, 1 µL of each primer (10 nM) and 3 µL of DNA template. All products were analyzed by electrophoresis in a 2% agarose gel with ethidium bromide (0.5 g / mL) in 0.5X TBE buffer (89 mM Tris, 89 mM boric acid; 2 mM EDTA), pH 8.4, and visualized with ultraviolet light; molecular size was estimated by comparisons with a 100-bp ladder.

Molecular Typing of isolates

The MLVA technique was used to identify isolates with five primer pairs for the VNTR loci 4, 7, 10, LB4 and LB5, as previously described (Salaün et al., 2006). Reference strains of *L. interrogans* serovar Canicola strain Canicola Hond Utrecht IV, *L. interrogans* serovar Hardjo strain Hardjoprajitno and *L. borgpetersenii* serovar Hardjo strain Hardjobovis were used as positive controls for each of the five PCRs for the VNTR loci that were analyzed. Additionally, amplification and partial sequencing of *sec Y* were used to identify and confirm genetic species, as previously described (Ahmed et al., 2006).

The products of *sec Y* gene amplification were purified with a commercial kit, quantified by a Qubit™ Fluorometer (Invitrogen Life Technologies, USA) and sequenced on a ABI3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using forward and reverse primers. Sequence quality was analyzed by the Phred program (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). The consensus sequences were obtained by CAP3 software (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/cgi-bin/phph/cap3.pl>), and identities were compared with all the sequences that were deposited in GenBank using the BLAST program (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). The identity matrix was created in the BioEdit program with the alignment and phylogenetic tree developed by the MEGA 6.06 program.

RESULTS AND DISCUSSION

From the 15 urine samples evaluated, two leptospire were found and were identified as the Londrina 49 and Londrina 54 strains from two cows that had MAT serological titers against serovar Hardjo of 400 and 800, respectively. According the figures 1 and 2, the results of MLVA for samples Londrina 49 and Londrina 54 are identical to the result obtained for the reference strain *L. borgpetersenii* serovar Hardjo Hadjobovis. BlastN software was used to compare the partial sequences of gene *sec Y*, and the sample sequences were found to be more similar to *L. borgpetersenii* serovar Hardjo strain Hardjobovis. Furthermore, in the phylogenetic tree, the isolate samples were grouped in the same cluster as the serovar Hardjo strain Hardjobovis GenBank reference (figure 3).

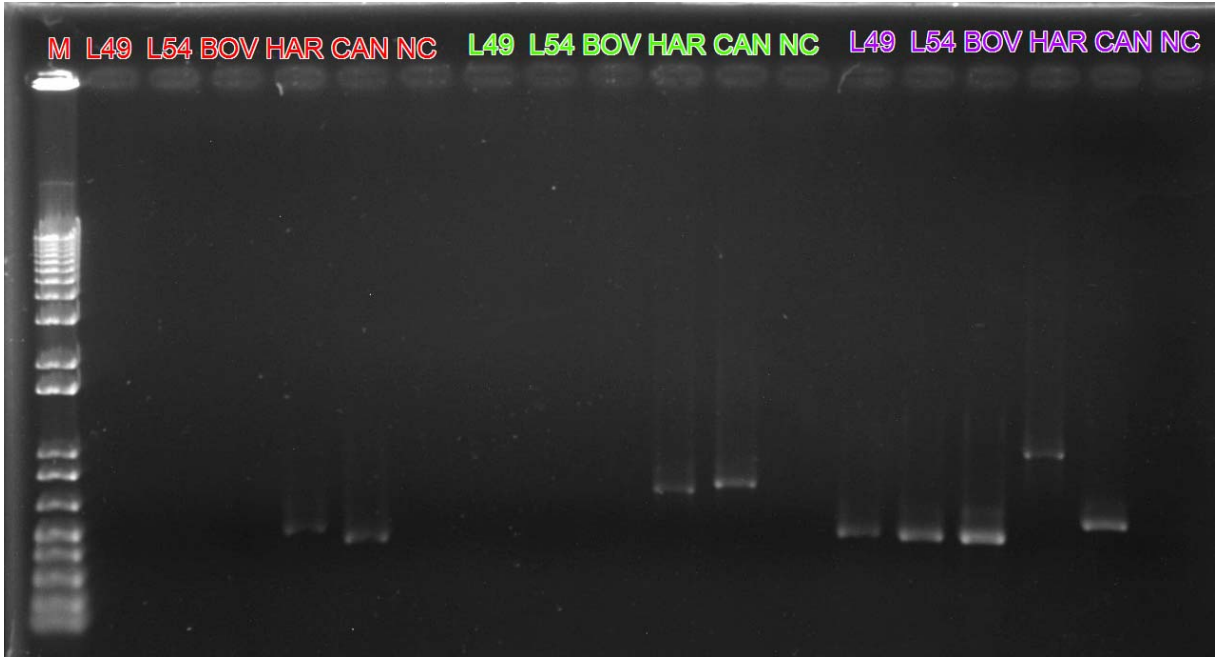


Figure 1 – Banding patterns of VNTR visualized with an agarose gel.

M- molecular ladder bp, L49 (Londrina 49 strain) and L54 (Londrina 54 strain); BOV- reference sample serovar Hardjo strain Hardjobovis; HAR- reference sample serovar Hardjo strain Hardjoprajitno; CAN- reference sample serovar Canicola strain Hond Utrecht IV; NC- negative control. Loci colors: red (VNTR- 4), green (VNTR-7), and purple (VNTR-10).

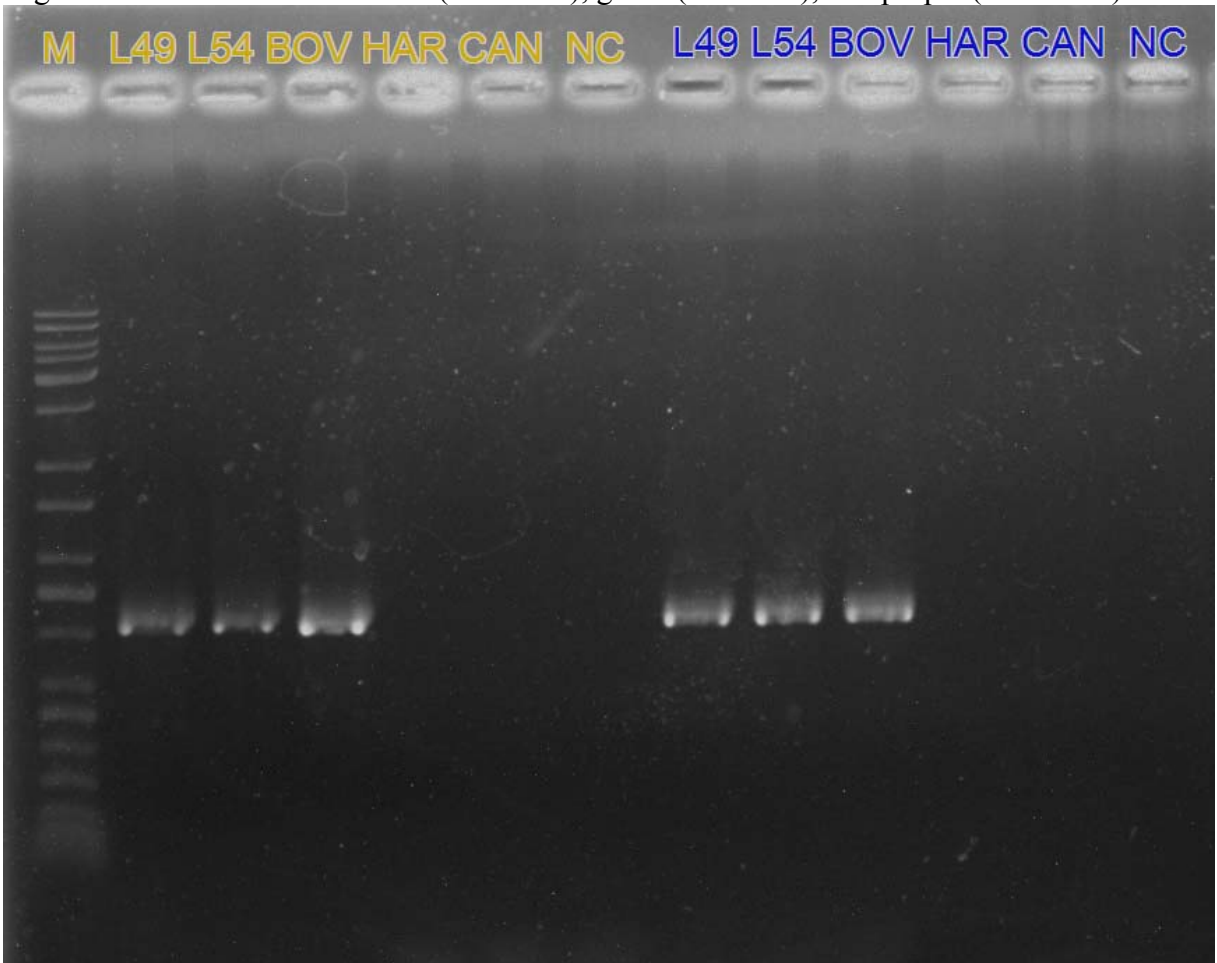


Figure 2 – Banding patterns of VNTR visualized with an agarose gel.

M- molecular ladder bp, L49 (Londrina 49 strain) and L54 (Londrina 54 strain); BOV- reference sample serovar Hardjo strain Hardjobovis; HAR- reference sample serovar Hardjo strain Hardjoprajitno; CAN- reference sample serovar Canicola strain Hond Utrecht IV; NC- negative control. Loci colors: yellow (VNTR-Lb4) and blue (VNTR-Lb5).

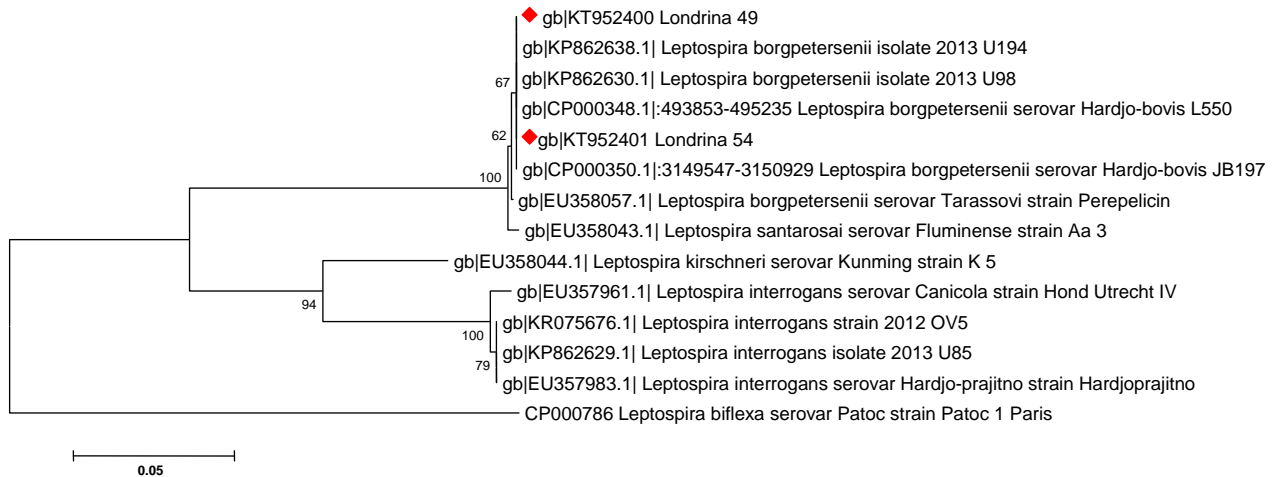


Figure 3 – Neighbor-joining phylogenetic tree of *sec Y* gene sequences from two strains that were isolated from cows (Londrina 49 and Londrina 54) and other GenBank *sec Y* sequences of leptospire strains. Bootstrap percentages were based on 1000 replications. The sequences obtained through sequencing were deposited in the GenBank database with the following access code: Londrina 49- KT952400 and Londrina 54- KT952401.

In bovine, Hardjo is the leptospira serovar that is most prevalent worldwide (Levett, 2001). Although the species *L. borgpetersenii* serovar Hardjo strain Hardjobovis and the species *L. interrogans* serovar Hardjo strain Hardjoprajitno cause the same reproductive problems in cattle, they are epidemiologically different. The strain Hardjobovis cannot tolerate a lack of nutrients, and its transmission cycle is limited to direct contact; alternatively, the strain Hardjoprajitno, after being eliminated in the urine, may survive months in aquatic environments until it infects a new host (Bulach et al., 2006).

L. interrogans serovar Hardjo strain Hardjoprajitno was initially isolated from cattle in the United Kingdom and is most commonly found in Europe (Bolin and Alt, 2001). However, the *L. borgpetersenii* serovar Hardjo strain Hardjobovis, which is considered to be the most common strain in cattle and the most prevalent in the world, was first isolated from a cattle herd in the United States of America (Bolin et al., 1989).

In Brazil, as well as Latin America, this is the first report that has isolated the species *L. borgpetersenii* serovar Hardjo strain Hardjobovis from naturally infected cattle. Before this study, only serological studies showed reagent animals with the serovar Hardjo in various countries (Favero et al., 2001; Hashimoto et al., 2012; Petrakovsky et al., 2014). However, this method not permit the differentiation between strains Hardjoprajitno and Hardjobovis.

Although bacterial isolation is the definitive diagnostic of leptospirosis, it is currently considered a major bottleneck for many research teams due to the difficult and laborious procedures used to obtain pure cultures of leptospire from the serovar Hardjo and to maintain them in a laboratory culture (Adler and de la Peña Moctezuma, 2010). Other studies in Brazil have used molecular methods to identify leptospira in cattle urine (Hamond et al., 2015a) and even in the reproductive tract of mares (Hamond et al., 2015b); however, none of these studies were successful in isolating the bacteria.

Antibody titers obtained in the MAT from both cows were only against the serovar Hardjo and did not distinguish between the strains Hardjobovis and Hardjoprajitno. The use of molecular methods, such as the MLVA, and genetic sequencing techniques allowed us to characterize the Londrina 49 and Londrina 54 strains that were isolated from the urine of two cows.

MLVA was a better molecular tool for differentiating most of the *Leptospira* serotypes, and the designs of the LB4 and LB5 primers made it possible to distinguish the species and strains of *L. borgpetersenii*, *L. interrogans*, and *L. kirschneri* (Salaün et al., 2006). In this study, this technique allowed us to characterize the isolates (Londrina 49 and Londrina 54 strains) as belonging to serovar Hardjo strain Hardjobovis according to the molecular profile shown in VNTR loci-4, VNTR-7 VNTR-10, VNTR-LB4 and VNTR-LB5. However, the results did not fully correspond with that described by Salaün et al. (2006) because the two isolated strains (Londrina 49 and Londrina 54) and the Hardjobovis reference strain did not amplify the VNTR loci-4. Therefore, this is considered a poor discriminatory loci for the species *L. borgpetersenii*. Using the combination of VNTR loci-7, VNTR loci-10, VNTR loci-LB4 and VNTR loci-LB5 was sufficient to identify that Brazilian isolated strains were the same strain of Hardjobovis and different from the strain of Hardjoprajitno. To confirm the MLVA results, partial sequencing was followed by phylogenetic analyses of gene *sec Y*.

Currently, this is the first report that isolated the serovar Hardjo strain Hardjobovis from the specie *L. borgpetersenii* in urine from naturally infected dairy cattle in Latin America. Genetic analysis showed that the MLVA associated with the partial sequencing of gene *sec Y* allowed a rapid molecular characterization and typing of isolated cultures (Londrina49 and Londrina54). Although these molecular techniques have a moderate cost and are not frequently used in routine diagnosis of leptospirosis, they are indispensable tools for bacterial isolate characterization and are easy to standardize and execute. Despite the fact that bacterial isolation is time-consuming and laborious, it is an important tool in the diagnosis of leptospirosis because the inclusion of isolated strains in the reference antigens battery, used in the MAT, will be useful in future epidemiological studies. Another direction will involve proteomics, where studies will evaluate intraspecies and serotype protein differences, thereby helping us to better understand the pathogenicity of various bacterial strains and enabling the creation of new types of vaccines for cattle with regional strains in endemic areas.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos for the *L. borgpetersenii* serovar Hardjo strain Hardjobovis. This work was supported by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) through the postgraduate program in Animal Science, State University of Londrina – Paraná – Brazil.

REFERENCES

- Adler B and de la Peña Moctezuma A (2010). *Leptospira* and leptospirosis. *Vet. Microbiol.* 140: 287–296.
- Ahmed N, Devi SM, Valverde Mde L, Vijayachari P, Machang'u RS, Ellis WA, Hartskeerl RA (2006). Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials.* 23: 28–44.
- Bolin CA, Thiermann AB, Handsaker AL, Foley JW (1989). Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine on *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjo-

- bovis infection of pregnant cattle. *Am J Vet Res.* 50: 161–165.
- Bolin CA and Alt DP (2001). Use of a monovalent leptospiral vaccine to prevent renal colonization and urinary shedding in cattle exposed to *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo. *Am. J. Vet. Res.* 62:995-1000.
- Bulach DM, Zuerner RL, Wilson P, Seemann T, et al. (2006). Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103: 14560–14565.
- Ellis WA (1994). Leptospirosis as a cause of reproductive failure. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 10(3): 463-478.
- Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P (1999). *Leptospira* and Leptospirosis. Medisci, Melbourne.
- Favero M, Pinheiro SR, Vasconcellos SA, Morais ZM, et al. (2001). Leptospirose Bovina - Variantes Sorológicas Predominantes Em Colheitas Efetuadas No Período De 1984 a 1997 Em Rebanhos De 21 Estados Do Brasil. *Arq. Inst. Biológico* 68: 29–35.
- Hamond C, Pestana CP, Medeiros MA, Lilenbaum W (2015a). Genotyping of *Leptospira* directly in urine samples of cattle demonstrates a diversity of species and strains in Brazil. *Epidemiol. Infect.* 16: 1–4.
- Hamond C, Pestana CP, Rocha-de-Souza CM, Cunha LER, et al. (2015b). Presence of leptospire on genital tract of mares with reproductive problems. *Vet. Microbiol.* 179: 264–269.
- Hanson LE (1982). Leptospirosis in domestic animals: the public health. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 181: 1505–1509.
- Hashimoto VY, Dias JA, Spohr KA H, Silva MCP, et al. (2012). Prevalência e fatores de risco associados á *Leptospira* spp. em rebanhos bovinos da região centro-sul do estado do Paraná. *Pesqui. Vet. Bras.* 32: 99–105.
- Levett PN (2001). Leptospirosis. *Clin. Microbiol.* 14: 296–326.
- Lilenbaum W and Martins G (2014). Leptospirosis in cattle: a challenging scenario for the understanding of the epidemiology. *Transbound. Emerg. Dis.* 61 Suppl 1: 63–68.
- Lindstedt BA (2005). Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis.* 26: 2567–2582.
- Majed Z, Bellenger E, Postic D, Pourcel C, et al. (2005). Identification of Variable-Number Tandem-Repeat Loci in *Leptospira interrogans* Sensu Stricto. *J. Clin. Microbiol.* 43: 539–545.
- Petrakovsky J, Bianchi A, Fisun H, Nájera-aguilar P, et al. (2014). Animal Leptospirosis in Latin America and the Caribbean Countries : Reported Outbreaks and Literature Review. 11(10): 10770–10789.
- Rinehart CL, Zimmerman AD, Buterbaugh RE, Jolie RA, et al. (2012). Efficacy of vaccination of cattle with the *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjoprajitno component of a pentavalent *Leptospira* bacterin against experimental challenge with *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo type hardjo-bovis. *American Journal of Veterinary Research* 73: 735-740.
- Salaün L, Mérien F, Gurianova S, Baranton G, et al. (2006). Application of multilocus variable-number tandem-repeat analysis for molecular typing of the agent of leptospirosis. *J. Clin. Microbiol.* 44: 3954–3962.
- Salgado M, Otto B, Sandoval E, Reinhardt G, et al. (2014). A cross sectional observational study to estimate herd level risk factors for *Leptospira* spp. serovars in small holder dairy cattle farms in southern Chile. *BMC Vet. Res.* 10: 126.
- Slack AT, Symonds ML, Dohnt MF, Smythe LD (2006). Identification of pathogenic *Leptospira* species by conventional or real-time PCR and sequencing of the DNA gyrase subunit B encoding gene. *BMC Microbiol.* 6: 95.

Zacarias FGDS, Vasconcellos SA, Anzai EK, Giraldi N, et al. (2008). Isolation of *Leptospira* serovars Canicola and Copenhageni from cattle urine in the State of Parana, Brazil. *Brazilian J. Microbiol.* 39: 744–748.

6 CONCLUSÕES

1. Existem diferenças epidemiológicas e moleculares entre os genótipos Hardjobovis e Hardjoprajitno do sorovar Hardjo
2. A técnica de MLVA e a análise filogenética do gene *sec Y* permitiram a diferenciação entre a *L. interrogans* sorovar Hardjo genótipo Hardjoprajitno e a *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo genótipo Hardjobovis
3. As amostras isoladas Londrina 49 e Londrina 54 foram tipificadas como genótipo Hardjobovis pelas técnicas moleculares MLVA e sequenciamento parcial do gene *sec Y*.
4. Estes dois isolamentos (Londrina 49 e Londrina 54) confirmam que o sorovar Hardjo genótipo Hardjobovis está circulante nos rebanhos bovinos brasileiros.
5. Este é o primeiro relato no Brasil e na América Latina do isolamento da *Leptospira borgpetersenii* sorovar Hardjo genótipo Hardjobovis da urina de bovinos naturalmente infectados.