

assim como a sorogrupadas com anticorpos policlonais. A técnica de SE-AFLP resultou no agrupamento das quatro estirpes com mais de 70% de similaridade genética, sendo definidos dois grupos acima de 90% de similaridade: A1 contendo as estirpes U79 e U65 dos sorogrupos Autumnalis e Australis, respectivamente; e A2 que apresenta as estirpes U73 e U232 dos sorogrupos Panama e Autumnalis, respectivamente, com o mesmo perfil de banda. Em relação ao perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, as estirpes de *L. noguchii* foram sensíveis à maior parte dos antimicrobianos testados, incluindo penicilina e ampicilina, que consistem no tratamento clássico da leptospirose. Gentamicina, neomicina, tetraciclina, sulfonamidas e fluoroquinolonas apresentaram maior variabilidade nos respectivos valores de concentração inibitória mínima. Dessa forma, apesar de a genotipagem apresentar alta similaridade, não foi observado correlação entre os agrupamentos genéticos com os sorogrupos das estirpes de *L. Noguchii*. **Palavras-chave:** Estirpes de *Leptospira*. Análise do polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificadas. Bovinos.

### IDENTIFICAÇÃO DE CÃES PORTADORES DE LEPTOSPIRAS PATOGENICAS MANTIDOS EM ABRIGOS COLETIVOS

MIOTTO, B. A.1; GUILLOUX, A. G.A.2; HORA, A. S.2; TOZZI, B. F.1; PENTEADO, M. S.1; HAGIWARA, M. K.1

1 Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

2 Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

A leptospirose é uma zoonose de distribuição cosmopolita causada pela infecção de bactérias patogênicas do gênero *Leptospira*. Cães podem tornar-se portadores, eliminando *leptospiras* pela urina de forma assintomática. Quando albergados em abrigos coletivos, podem atuar inadvertidamente como fonte de infecção para outros cães, tratadores e adotantes. Esse estudo foi delineado para investigar a presença de cães portadores de *leptospiras* patogênicas mantidos em abrigos coletivos. Foram coletadas amostras de urina e sangue de 92 cães albergados no canil da Prefeitura do Campus Universitário da USP, São Paulo, entre julho e dezembro de 2013. Os cães foram avaliados por qPCR quanto à presença de *leptospiras* em amostras de urina e sangue por meio da amplificação de fragmento parcial do gene lipL32. Os animais leptospirúricos foram reavaliados periodicamente quanto à persistência da eliminação renal e à presença de títulos de anticorpos pela soroaglutinação microscópica (SAM), além de serem submetidos a coletas de urina por cistocentese para cultivo e isolamento bacteriano. Dos 92 animais examinados, dez cães apresentaram leptospirúria, sendo identificados dois animais (A e B) com eliminação persistente ao longo das reavaliações. Esses cães foram examinados em 12 e 16 ocasiões, respectivamente, pelo período de 14 semanas. Ambos foram positivos à qPCR em todas as ocasiões, o isolamento de *leptospiras* foi obtido em duas avaliações do animal A e em cinco avaliações do animal B. Não foi observada soroconversão, assim como não foi estabelecida a identificação direta do agente em amostras de sangue, caracterizando o estado portador renal nos dois animais com eliminação persistente de *leptospiras* na urina. **Palavras-chave:** Cães. *Leptospira*. Abrigo para animais.

### IMUNOGLOBULINAS Y POLICLONAIS ANTILEPTOSPIRA SPP.: PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO

GOMES, D. O.1; PIRES, B. C.1; TAVARES, T. C. F.1; SOARES, P. M.1; SOUZA, M. A.1; LIMA, A. M. C.1

1 Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil.

Ovos de galinhas imunizadas produzem imunoglobulinas denominados imunoglobulinas Y ou IgY, que têm apresentado várias aplicações em imunodiagnóstico, imunoterapia e estudos de proteínas imunorreagentes. O presente trabalho foi delineado para investigar se as IgYs de galinhas imunizadas com uma solução de *Leptospira interrogans* inativadas e proteínas de membrana externa do sorovar Hardjo poderiam ser detectadas em testes ELISA para o diagnóstico de Leptospirose. Oito galinhas com 25 semanas de idade, da raça White Leghorn, foram divididas em três grupos: A) três imunizadas com uma suspensão de *leptospiras* inativadas; B) três imunizadas com uma solução de proteínas de membrana externa extraída do sorovar Hardjo; e C) duas não inoculadas, controle. As coletas de sangue foram procedidas quinzenalmente e as de ovos diariamente. A IgY foi purificada com o processo de delipidação da gema dos ovos utilizando método de diluição em água

ácida, e a precipitação com sulfato de amônio. Verificou-se que houve a produção de anticorpos *antiLeptospira*, tanto no soro quanto nas gemas purificadas, pelos testes de ELISA. O pico de produção de anticorpos específicos ocorreu na 5ª semana após a primeira imunização. Ficou demonstrada a possibilidade da indução da produção de anticorpos específicos em galinhas imunizadas com *leptospiras* do sorovar Hardjo inativadas, bem como com proteínas de membrana externa (PME) extraídas desse sorovar. As galinhas imunizadas com uma suspensão de *leptospiras* inativadas ou com PME de *Leptospira interrogans* do sorovar Hardjo produziram anticorpos reativos a PME Hardjo detectáveis no teste ELISA. **Palavras-chave:** Imunoglobulinas. IgY. *Leptospira interrogans*. Proteínas de membrana externa.

### ISOLAMENTO DE ESTIRPES DE LEPTOSPIRA SPP. EM DIFERENTES ESPÉCIES DE HOSPEDEIROS QUE CONVIVEM EM AMBIENTE RURAL NA REGIÃO SUL DO BRASIL

SILVA, F. J.1; LOFFLER, S. G.4; BRIHUEGA, B.4; SANTOS, C. E. P.3; VASCONCELLOS, S. A.2; MATHIAS, L.A.1

1 Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, Brasil.

2 Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

3 Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brasil.

4 Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária, Castelar, Argentina.

O presente trabalho relata o isolamento de estirpes de *Leptospira* spp. em diferentes espécies de hospedeiros que convivem em área rural na região sul do Brasil. Houve aprovação de comissões de ética humana e animal. Em dezembro de 2012, amostras de urina foram colhidas de animais de vida livre, domésticos e humanos em pequenas propriedades rurais de municípios da região sul. A pesquisa de *leptospiras* foi efetuada por cultivos de amostras de urina semeadas nos meios de Fletcher e de Ellinghausen - McCullough - Johnson - Harris (EMJH). Cultivos apresentando crescimento de *leptospiras* foram encaminhados ao Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária, Buenos Aires, Argentina, e as estirpes de *leptospiras* isoladas foram genotipadas com emprego da técnica de Multiple Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA). A tipificação empregou os VNTR 4, 7, 9, 10, 19, 23, 31, Lb4 e Lb5, que discriminam estirpes de *L. interrogans* e *L. borgpetersenii*. Em Urubici, SC, foi identificada a estirpe *Leptospira interrogans Canicola Hond Utrecht IV* em um *Didelphis aurita*, em uma vaca e em uma mulher. Em Santana da Boa Vista, RS, foi identificada a estirpe *Leptospira interrogans Icterohaemorrhagiae Copenhageni L1-130*, em um *Euphractus sexcinctus* e em um cão, a mesma estirpe foi isolada de um cavalo e de um homem em Cruz Alta, RS. Em Chuí, RS, foi identificada estirpe *Leptospira interrogans Icterohaemorrhagiae RGA* em um *Myocastor coypus* e estirpe *Leptospira interrogans Icterohaemorrhagiae Copenhageni L1-130* em uma ovelha. Os resultados obtidos indicam a possibilidade de transmissão interespecífica do agente em ambientes rurais. **Palavras-chave:** Estirpes de *Leptospira*. MLVA. Transmissão.

### ISOLAMENTO DE LEPTOSPIRA BORGPETERSENII de CEBUS APELLA EM PROPRIEDADE RURAL DE AGRICULTURA FAMILIAR DA CHAPADA DOS GUIMARÃES, MT

SILVA, F. J.1; SANTOS, C. E. P.3; LOFFLER, S. G.4; SILVA, T. R.1; BRIHUEGA, B.4; VASCONCELLOS, S. A.2; MATHIAS, L. A.1

1 Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, Brasil.

2 Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, SP, Brasil.

3 Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brasil.

4 Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária, Castelar, Argentina.

Primates não humanos de vida livre são importantes fontes de infecção de *leptospiras* para humanos e animais domésticos. Por serem astutos, suas capturas são difíceis e pouco frequentes, situação que oferece especial desafio ao estudo de isolamento de *leptospiras*. O objetivo do trabalho é descrever um caso de isolamento de *Leptospira borgpetersenii* de um espécime de *Cebus apella*. Houve aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais, protocolo 027958/10. Por cistocentese, foi realizada a colheita de urina de um macho adulto capturado em uma pequena propriedade rural da Chapada dos Guimarães, MT, em agosto de 2012. A pesquisa de *Leptospira* spp. na urina foi efetuada por cultivos nos meios de Fletcher e de Ellinghausen - McCullough - Johnson - Harris (EMJH). Após observação do crescimento de espiroquetas em microscopia de campo escuro, a estirpe isolada foi encaminhada ao Laboratório de Leptospirose do Instituto de Patobiologia, Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária, Buenos Aires, Argentina, onde foi genotipada com o emprego da técnica de Multiple Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA). O procedimento de tipificação empregou

os VNTR 4, 7, 9, 10, 19, 23, 31, Lb4 e Lb5, que discriminam as espécies *L. interrogans* e *L. borgpetersenii*. A estirpe isolada foi identificada como *Leptospira borgpetersenii*. Não foi possível identificar o sorovar do microrganismo isolado. Primatas frequentemente interagem com humanos e animais domésticos, sendo importante o ensino de ações de educação ambiental a moradores de áreas rurais, com o intuito de, além da preservação ambiental, minimizar riscos de transmissão do agente. **Palavras-chave:** *Leptospira*. MLVA. Primatas.

#### ISOLAMENTO DE LEPTOSPIRA INTERROGANS DE ESPÉCIES SELVAGENS DE VIDA LIVRE EM REGIÕES SEMIÁRIDAS DO NORDESTE BRASILEIRO

SILVA, F. J.1; SILVA, T. R.1; LOFFLER, S. G.4; SANTOS, C. E. P.3; BRIHUEGA, B.4; VASCONCELLOS, S. A.2; MATHIAS, L. A.1

- 1 Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, Brasil.
- 2 Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, SP, Brasil.
- 3 Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brasil.
- 4 Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária, Castelar, Argentina.

O objetivo do presente trabalho é descrever o isolamento de *Leptospira interrogans* de espécies selvagens de vida livre em regiões semiáridas do Nordeste brasileiro. Houve aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais, protocolo 027958/10. Entre fevereiro e março de 2012, em pequenas propriedades rurais de Sobral, CE, e Sobradinho, BA, foram colhidas amostras de urina de um *Cavea aperea*, dois *Euphractus sexcinctus* e um *Cercdocyon thous*. A pesquisa de *leptospiras* foi efetuada por cultivos de amostras de urina semeadas nos meios de Fletcher e de Ellinghausen - McCullough - Johnson - Harris (EMJH). Os cultivos apresentando crescimento de *leptospiras* foram encaminhados ao Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária, Buenos Aires, Argentina, e as estirpes de *leptospiras* isoladas foram genotipadas com o emprego da técnica de Multiple Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA). A tipificação empregou os VNTR 4, 7, 9, 10, 19, 23, 31, Lb4 e Lb5, que discriminam estirpes de *L. interrogans* e *L. borgpetersenii*. As quatro amostras isoladas foram identificadas como *Leptospira interrogans*, sendo duas identificadas como *Leptospira interrogans* sorovariedade Pomona. Não foi possível identificação dos sorovares das outras duas estirpes isoladas. O sorovar Pomona acarreta prejuízos econômicos na produção industrial de suínos e o registro de reservatórios selvagens desse sorovar serve para conhecimento da epidemiologia da leptospirose suína. O consumo da carne de espécies de tatu é cultural em áreas rurais brasileiras, sendo importante o ensino de ações de educação ambiental a seus moradores, visando, além da preservação ambiental, a minimizar riscos de transmissão do agente. **Palavras-chave:** Caatinga. *Leptospira*. MLVA

#### ISOLAMENTO DE LEPTOSPIRA INTERROGANS SOROGRUPO ICTEROHAEMORRHAGIAE SOROVAR COPENHAGENI IDÊNTICA À ESTIRPE FIOCROZ L1-130 DE UMA FÊMEA FILHOTE DA ESPÉCIE LEOPARDUS TIGRINUS DE VIDA LIVRE NO MUNICÍPIO DE ALEGRETE, RS

SILVA, F. J.1; LOFFLER, S. G.4; SANTOS, C. E. P.3; BRIHUEGA, B.4; VASCONCELLOS, S. A.2; MATHIAS, L. A.1

- 1 Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, Brasil.
- 2 Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, SP, Brasil.
- 3 Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brasil.
- 4 Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária, Castelar, Argentina.

A classe *Mammalia* é a principal fonte de infecção de *leptospiras*. Entretanto, estudos de isolamento da bactéria em espécimes da família *Felidae* são bastante desafiadores devido à rara obtenção de um indivíduo infectado, principalmente tratando-se de um felino de vida livre. O objetivo do trabalho é relatar um caso de isolamento de *Leptospira interrogans* de um indivíduo da espécie *Leopardus tigrinus*. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, protocolo 027958/10. A coleta de urina foi realizada após a micção espontânea de uma fêmea filhote capturada em uma pequena propriedade rural do município de Alegrete, RS, em dezembro de 2012. A pesquisa de *Leptospira* spp. na urina foi efetuada por cultivos nos meios de Fletcher e de Ellinghausen - McCullough - Johnson - Harris (EMJH). Após observação do crescimento de espiroquetas em microscopia de campo escuro, a estirpe isolada foi encaminhada ao Laboratório de Leptospirose do Instituto de Patobiologia, Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária, Buenos Aires, Argentina, onde foi genotipada com o emprego da técnica de Multiple Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA). O procedimento de tipificação empregou os VNTR 4, 7, 9, 10, 19, 23, 31, Lb4 e Lb5,

que discriminam estirpes de *L. interrogans* e *L. borgpetersenii*. Após a genotipagem, a estirpe isolada foi identificada como *Leptospira interrogans* sorogrupo *Icterohaemorrhagiae*, sorovar *Copenhageni*, idêntica à estirpe *Fiocruz L1-130*. O isolamento de uma estirpe patogênica para animais domésticos e humanos evidencia a necessidade da prática de bons hábitos sanitários nas propriedades rurais de agricultura familiar. **Palavras-chave:** Felidae. *Leptospira*. MLVA.

#### ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LEPTOSPIRA INTERROGANS SOROGRUPO ICTEROHAEMORRHAGIAE DE CÃO COM LEPTOSPIROSE CLÍNICA

GRASSMANN, A. A.1; CUNHA, C. E. P.1; KREMER, F. S.1; ESLABÃO, M. R.1; FRANÇA, R. C.1; DELLAGOSTIN, O. A.1; MCBRIDE, A. J. A.1

- 1 Unidade de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

A leptospirose é uma importante zoonose causada por espécies patogênicas do gênero *Leptospira*. Cães domésticos ocupam uma posição central na transmissão de *leptospiras* a humanos devido à proximidade entre as espécies. A profilaxia da leptospirose canina é baseada em vacina, que deveria incluir sorovares prevalentes na região, visando a ajudar a evitar não apenas a leptospirose canina, mas auxiliar a prevenção da transmissão da bactéria a humanos. Neste trabalho nós apresentamos o isolamento e caracterização molecular de *Leptospira interrogans* sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* de um cão apresentando leptospirose clínica. Esse cão, com dez meses de idade, sexo feminino foi atendido em uma clínica veterinária em Pelotas-RS, apresentando sinais característicos de leptospirose. Sangue foi coletado do animal, antes da antibioticoterapia, e inoculado em EMJH. Após 30 dias foi confirmada a presença de *leptospiras* na cultura. O isolado apresentou genes de virulência, conforme evidenciado por PCR. O genoma foi sequenciado, permitindo a análise de genes do esquema de MLST descrito por Boonsilp *et al.* (2013). O isolado apresentou o ST 17, que inclui *L. interrogans* sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* sorovar *Icterohaemorrhagiae* e sorovar *Copenhageni*. Após três passagens *in vitro*, a virulência foi avaliada por inoculação de 10<sup>8</sup> *leptospiras* por animal, num total de três hamsters adultos. Todos os animais foram eutanasiados quando atingiram os *end points* para mortalidade por leptospirose, seis dias após a inoculação. Concluindo, nós isolamos uma cepa virulenta (nomeada UFPEL-RCA) de *L. interrogans* sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* de um cão com leptospirose clínica. **Palavras-chave:** Isolamento. Leptospirose. Cães. MLST. *Leptospira interrogans serovar icterohaemorrhagiae*.

#### ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE LEPTOSPIRAS PATOGENICAS EM CÃES COM SUSPEITA CLÍNICA DE LEPTOSPIROSE

TOZZI, B. F.1; MIOTTO, B. A.1; PENTEADO, M. S.1; HAGIWARA, M. K.1

- 1 Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

A leptospirose é uma zoonose bacteriana decorrente da infecção por espécies patogênicas do gênero *Leptospira*. Cães infectados podem apresentar alterações clínico-laboratoriais inespecíficas, sendo necessária a realização de diferentes testes para o diagnóstico da doença. O objetivo deste estudo foi relacionar os achados clínico-laboratoriais com resultados de PCR, SAM e isolamento para realizar o diagnóstico da leptospirose em cães com suspeita clínica da doença. Foram coletadas amostras de sangue, soro e urina de 24 cães atendidos no Serviço de Clínica Médica do Hospital Veterinário da FMVZ, São Paulo, entre fevereiro de 2013 e julho de 2015, apresentando quadro de azotemia associado à ocorrência de sinais clínicos compatíveis com leptospirose aguda. As amostras de sangue e urina foram destinadas à detecção de material genético de *leptospiras* por meio da PCR e ao cultivo bacteriano. Amostras de soro foram destinadas à avaliação dos títulos de anticorpos pela soroaaglutinação microscópica. Dentre os 24 cães incluídos no estudo, 13 apresentaram amplificação de material genético de *leptospiras* em amostras de urina e/ou sangue. Dez animais apresentaram títulos variando de 100 a 3.200. Seis cães foram reavaliados em mais de uma ocasião, não sendo observada soroc conversão em nenhum dos casos. Foi possível obter isolamento do patógeno em amostras de urina de dois animais. O animal A foi atendido em uma única ocasião, na qual apresentou