



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE ARAGUAÍNA
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

GÉSSICA GOMES MARINHO

RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO:
DIAGNÓSTICO DE LEPTOSPIROSE PELO TESTE DE AGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA
(MAT) EM ANIMAIS

Araguaína-TO

2019

GÉSSICA GOMES MARINHO

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO:
DIAGNÓSTICO DE LEPTOSPIROSE PELO TESTE DE AGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA
(MAT) EM ANIMAIS**

Relatório de estágio curricular supervisionado apresentado ao curso de Medicina Veterinária da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal do Tocantins, como requisito parcial para a obtenção do título de Médica Veterinária.

Orientador (a): Prof^ª. Dr^ª. Katyane de Sousa Almeida

Supervisor: Prof. Dr. Anna Monteiro Correia Lima

Araguaína-TO

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

M338r Marinho, Géssica Gomes.

Relatório de Estágio Curricular Supervisionado Obrigatório: Diagnóstico de Leptospirose pelo Teste de Aglutinação Microscópica (MAT) em Animais . / Géssica Gomes Marinho. – Araguaína, TO, 2019.

51 f.

Monografia Graduação - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Araguaína - Curso de Medicina Veterinária, 2019.

Orientadora : Prof^ª. Dr^ª. Katyane De Sousa Almeida

1. Leptospira spp.. 2. Microaglutinação . 3. Soroaglutinação. 4. Sorovares.
I. Título

CDD 636.089

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

GÉSSICA GOMES MARINHO

RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO:
DIAGNÓSTICO DE LEPTOSPIROSE PELO TESTE DE AGLUTINAÇÃO MICROSCÓPICA
(MAT) EM ANIMAIS

Relatório de estágio curricular supervisionado apresentado ao curso de Medicina Veterinária da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal do Tocantins, como requisito parcial para a obtenção do título de Médica Veterinária.

Orientador (a): Prof^ª. Dr^ª. Katyane de Sousa Almeida
Supervisor: Prof^ª. Dr^ª. Anna Monteiro Correia Lima

Aprovado em 01 / 07 / 2019

BANCA EXAMINADORA



Prof^ª Dr^ª Katyane de Sousa Almeida - UFT Orientadora



Prof^ª Dr^ª – Ana Patrícia Carvalho da Silva



Prof^ª Dr^ª – Helciléia Dias Santos

Dedico a Deus por estar sempre ao meu lado, aos meus avós por todo amor e carinho e ao meu filho por ser a razão de ter chegado até aqui.

AGRADECIMENTOS

Início meus agradecimentos, gratulando a DEUS, por me conceder o dom da vida e saúde abundante, sempre me amar e entender minhas dores, ter compaixão de mim, mesmo sendo falha, fraca e pecadora, e de igual maneira me amparar sempre em seus braços e proporcionar conforto pra minha alma, de forma que sempre tenho me sentido amada e agraciada por sua presença em meu coração, pois sempre tem iluminado meus passos e meus caminhos, independentemente de onde eu tenha passado ou passe.

Ao meu filho João Lucas Gomes Marinho que mesmo sem ele saber, foi de onde tirei todas as minhas forças para concluir a graduação. Te amo, razão da minha vida.

Aos meus amados avós Raimundo Pereira Araújo e Angelina Gomes Araújo, que me amam, me protegem, cuidam de mim, me incentivam, estão sempre prontos pra me levantar se eu cair, e principalmente por acreditar na pessoa que eu me tornei, que acreditam que todo meu esforço será recompensado de alguma forma algum dia. Saibam que todas as minhas tentativas de ser melhor é pra um dia poder retribuir pra vocês tudo o que fizeram e fazem por mim.

Agradeço ao meu namorado Dianari Gomes Campos, que jamais me negou amor, apoio, carinho e incentivo. Obrigado “meu Preto”, por aguentar tantas crises de estresse e ansiedade, por se desdobrar em esforços para me ajudar durante a graduação e a elaboração desse trabalho. Obrigada pelos cafés, por limpar minha casa e por ouvir minhas lamentações. Sem você do meu lado tudo isso não seria possível.

Aos meus irmãos e irmãs (Andréia, Gleiciane, Adriana, Adelson, Adalto, Adriane, Kaytia, Josenildo, Adriene), que contribuíram de forma direta e indireta para essa conquista, independente de tudo, tenho em todos vocês um grande exemplo de força e determinação que sempre conseguem tudo o que querem independente do que vocês tenham que fazer, vocês são as pessoas que mais amo no mundo e que sempre estarei disponível para vocês, independentemente da situação. Em especial, minha caçulinha, Jercy Gabriella por se dedicar e amar tanto meu filho, te amo muito “bicha feia” sempre estarei aqui.

Aos meus pais Deronildes e João Batista (in memoriam), que não estão mais entre nós, mas continuam me dando força na vida e sei que sempre estão ao meu lado me protegendo de alguma forma, sei que estão com muito orgulho de mim. Suas lembranças me inspiram e me fazem persistir.

À minha família dedico meu amor de forma incondicional, essa conquista que alcanço também é de vocês. Em especial minha tia Elvira Maria por ser uma mãe-avó para meu filho e a minha prima Weudina por todo amor e dedicação ao meu príncipe.

Agradeço a todos os meus amigos que estiveram juntos a mim durante minha vida universitária. Na memória ficam todos os bons momentos, os momentos de desespero, os momentos pré - prova e principalmente os pós - prova (mesmo quando se tratava de apenas dormir), dos encontros, festas, momentos que passam os juntos. Em especial minhas amigas Gisele Lima Karajá e Jenniffer Rodrigues Fernandes. Acreditem, vocês estarão para sempre marcadas nas páginas do livro da minha vida. Aos demais, que são muitos, vocês sabem quem são e sabem da importância que tem e que tiveram durante minha vida acadêmica.

Agradeço ainda à todos os meus orientadores ao decorrer da minha vida acadêmica, à minha orientadora de TCC Katyane de Sousa Almeida, de monitoria Anna Kelen Felipe Lima e às minhas orientadoras de iniciação científica Ana Patrícia de Carvalho da Silva e Helciléia Dias Santos, por acreditar em meu potencial, pela confiança, por todos os ensinamentos, com certeza me tornei uma profissional que tem vocês como espelho e espero ser como vocês um dia, muito obrigada.

Agradeço as minhas companheiras de aluguel, que mesmo com todas as dificuldades que tenhamos passados juntos, isso nunca foi um motivo para aceitar que fossemos menos do que alguém, viver com vocês foi um aprendizado que me preparou para a vida e a sobreviver as mais adversas situações sorrindo, a vocês meu muito obrigada.

Mesmo sem haver necessidade alguns nomes não podem deixar simplesmente de estar aqui, aos amigos que perdi durante essa caminhada, Mariana Nunes (in memoriam) uma amiga inestimável, agradeço por ter vivido e dividido com você momentos inesquecíveis que enriqueceram a minha vida e proporcionar lembranças ímpares, minha admiração por você é e sempre será única, não importa onde você estiver agora.

Maiara Aparecida, (in memoriam) minha amiga inconsequente e ao mesmo tempo responsável, inteligente e que teve um coração sem maldade, obrigada por não se importar com quem eu era ou tinha, por me deixar mais próxima de Deus, apenas foi minha amiga, queria poder te dizer que tudo isso, foi para mim muito valiosa, pena que não tive tempo de te dizer isso em vida. Meu muito obrigada.

A minha supervisora de estágio Anna Monteiro Correia Lima por me ensinar cada detalhe com muito carinho! Obrigada por ser uma supervisora extraordinária.

Agradeço à banca examinadora, Prof^a Dr^a Ana Patrícia Carvalho da Silva, Prof^a Dr^a

Helciléia Dias Santos e a Prof^ª Dr^ª Katyane de Sousa Almeida, por tão gentilmente terem aceitado compartilhar comigo deste passo tão importante em minha profissão.

As meninas do laboratório: Gabriela Alves, Melissa Alves, Fernanda Mendes, Gabriela Ribeiro, Lara Reis, Daiane Olímpia e Andreia Zago, pelo companheirismo ao longo desta jornada e por terem sido peças fundamentais na conclusão deste trabalho.

A minha amiga Taís, por ter me ajudado tanto na chegada em Uberlândia sem nem me conhecer o bastante, obrigada por ser esse anjo.

Ao laboratório de Doenças Infectocontagiosas, por ter me proporcionado a estrutura necessária para a realização deste trabalho. A todos que, de alguma forma, contribuíram para que eu pudesse chegar até aqui. Muito obrigada!

RESUMO

As atividades intrínsecas ao estágio curricular supervisionado foram desenvolvidas no Laboratório de doenças infecciosas da Universidade Federal de Uberlândia (Ladoc-UFU), Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, sob supervisão da Prof^a. Dra. Anna Monteiro Correia Lima, no período de 08 de abril a 18 de junho perfazendo um total de 400 horas. No laboratório foram acompanhadas todas as atividades realizadas, o que incluía lavagem, esterilização e organização de materiais e equipamentos do laboratório, realização e interpretação de cultura de micro-organismos, teste de susceptibilidade a antimicrobianos (TSA ou Antibiograma), e ensaios rápidos imunocromatográficos. Realização e interpretação de exames para leptospirose, em especial o Teste de Aglutinação Microscópica (MAT), sendo a leptospirose uma doença infectocontagiosa, que acomete os animais e os seres humanos e de caráter zoonótico, será o enfoque do trabalho. Durante o estágio foi realizado 62 MAT, foram testados 26 bovinos, sendo sete⁷ animais reagentes para os sorovares Hardjoprajitino e Wolffi, 22 cães, sendo quatro animais reagentes para os sorovares Bratislava e Icterohaemorrhagiae, e 14 ovinos, todos negativos. O estágio curricular foi de suma importância, pois permitiu a inserção da prática laboratorial no cotidiano profissional tão necessário para uma boa capacitação da graduanda, uma vez que é responsabilidade exclusiva do Médico Veterinário a execução das técnicas de diagnósticos que permitem contribuir com a promoção da Saúde Humana e Animal.

PALAVRAS – CHAVE: Leptospira spp.. Microaglutinação. Soroaglutinação. Sorovares.

ABSTRACT

The activities intrinsic to the curricular internship supervised were developed in laboratory of infectious diseases at the Universidade Federal de Uberlândia (UFU-Ladoc), Department of veterinary medicine of the Universidade Federal Uberlândia, under supervision of prof^ª. Dr Anna Monteiro Correia Lima, during the period from April 08 to June 18 for a total of 400 hours. In the lab were accompanied all activities, which included washing, sterilization and organization of laboratory materials and equipment, accomplishment and interpretation of culture of micro-organisms, antimicrobials susceptibility test (TSA), and quick imunocromatográficos trials. Accomplishment and interpretation of tests for *Leptospira* especially the Microscopic Agglutination Test (MAT), being leptospirosis an infectious disease that affects animals and humans in zoonotic character, will be the focus of the work. During the internship was carried out 62 MAT, were 26 tested bovine, being seven animals reagents for the Hardjoprajitino serovars and Wolffi serovars, 22 dogs, being four animals reagents for the Bratislava Icterohaemorrhagiae serovars, and 14 sheep, all negative. The intership curricular was of utmost importance, because it allowed the insertion of laboratory practice in everyday professional life so necessary for a good training of graduating, since it is the exclusive responsibility of the Veterinarian execution the techniques of diagnostics that allow to contribute to the promotion of human and animal health.

KEY WORDS: *Leptospira* spp.. Micro-agglutination. Serum agglutination. Serovars.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Estrutura Física do Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia-UFU-MG, 2019. A) Entrada do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva. B) Entrada do Laboratório de Doenças Infectocontagiosas..... 19
- Figura 2** - Estrutura física do Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia-UFU- MG, 2019. A) Sala de cultura, B) Sala de lavagem e esterilização de material contaminado..... 19
- Figura 3** – Estrutura do Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia-UFU-MG, 2019. A) Sala de lavagem e esterilização de material não contaminado B) sala de microscopia..... 20
- Figura 4** – Estrutura física do Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia-UFU- Uberlândia– MG, 2019. (A) Sala de estudos e bancadas de uso comum para exames de rotina. B, C)Sala para técnicas moleculares, e uma capela de fluxo laminar apenas para preparo de mix para o uso em Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....20
- Figura 5** – Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia-UFU- Uberlândia– MG, 2019. Separação do sangue total em soro e coágulo após centrifugação. 30
- Figura 6-** – Preparação do meio Ellinghausen-Mac Cullough-Johnson-Harris (EMJH) no Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia-UFU-Uberlândia–MG, 2019. A) pesagem do meio; B) diluição do meio EMJH em água destilada; C) fita de medição do pH da solução com pH. 31
- Figura 7** - Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia-UFU- Uberlândia– MG, 2019. A) Soro de coelho estéril CRIPION® em banho maria. 32
- Figura 8**— Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia-UFU- Uberlândia– MG, 2019. Filtragem do soro de coelho e adição ao meio Ellinghausen-McCullough-Johnson- Harris (EMJH). 32
- Figura 9**– Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia-UFU- Uberlândia– MG, 2019. Sorovares de *lesptospira* mantidos em estufa BOD sob T° 28 °C. 35

Figura 10– Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia-UFU- Uberlândia– MG, 2019Placa para o exame Teste de Aglutinação Microscópica (MAT) para leptospira na etapa triagem. 36

Figura 11– Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia-UFU- Uberlândia– MG, 2019Leitura do Teste Aglutinação Microscópica (MAT). A) Resultado negativo. B) Resultado positivo 37

Figura 12–Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia-UFU- Uberlândia– MG, 2019. Placa para exame sorológico, Teste de Aglutinação Microscópica (MAT), etapa titulação. 38

Gráfico 1- Código, sorogrupo e variante sorológica das *Leptospira* spp. utilizadas na rotina do Laboratório de Doenças infecciosas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), MG - 2019 30

Gráfico 2- Porcentagem de bovinos reagentes para *Leptospira* spp. no Teste de Aglutinação Microscópica (MAT) de acordo com os sorovares encontrados no período de 08/04/2019 à 18/06/2019..... 39

Gráfico 3. Porcentagem de caninos reagentes para *Leptospira* spp. no Teste de Aglutinação Microscópica (MAT) de acordo com os sorovares encontrados no período de 08/04/2019 à 18/06/2019..... 40

Quadro 1 – Laboratório de Doenças infecciosas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), MG - 2019.Código, sorogrupo e variante sorológica das *Leptospira* spp. utilizadas na rotina. 34

Quadro 2- Sorovares usados para o exame Teste de Aglutinação Microscópica (MAT) contendo um representante de cada sorogrupo mais prevalente na região, nas etapas de triagem e titulação- Universidade Federal do Tocantins- UFU 2019 36

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Exames acompanhados no Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU)- MG- durante o período de 08/04/2019 à 18/06/2019.....21
- Tabela 2 -** Diagnóstico de ensaios imunocromatográficos acompanhados no Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) MG-2019.21
- Tabela 3 -** Teste de aglutinação microscópica etapa triagem realizada para diagnóstico de Leptospirose na Universidade Federal de Uberlândia (UFU) no período de 08/04/2019 à 18/06/2019.....37
- Tabela 4.** Sorovares reagentes de acordo coma espécie e suas respectivas titulações- Laboratório de doenças infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) no período de 08/04/2019 à 18/06/2019..... 40

LISTA DAS ABREVIACOES

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
°C	Graus Celsius
Dra	Doutora
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EMJH	Ellinghausen-Mac Cullough-Johnson-Harris
g	Gramas
LADOC	Laboratório de doenças infectocontagiosas
MAT	Teste de Aglutinao Microscópica
mL	Mililitro
OMS	Organizao Mundial da Saúde
PCR	Reao em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
spp	Espécies
T°	Temperatura
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
µL	Micro litro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 LOCAL DE ESTÁGIO	18
3 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	21
4 LEPTOSPIROSE	23
4.1 Revisão de Literatura	23
4.2 Etiologia	24
4.3 Características do micro-organismo	24
4.4 Epidemiologia e saúde pública.....	25
4.5 Patogenia e sinais clínicos.....	27
4.6 Diagnóstico	27
4.7 Prevenção e controle	28
4.8 Diagnóstico de Leptospirose pelo Teste de Aglutinação Microscópica no Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia	30
4.9 Preparo de meio de cultura para Leptospira spp.	31
5 Manutenção e repique das leptospiras.....	34
5.1 Teste de Aglutinação Microscópica (MAT) para Triagem	35
5.2 Teste de Aglutinação Microscópica (MAT) para Titulação.....	38
5.3 Discussão.....	41
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
7 REFERÊNCIAS	46
8 ANEXOS	51

1 INTRODUÇÃO

As atividades inerentes ao estágio curricular supervisionado foram desenvolvidas no Laboratório de Doenças infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia (Ladoc-UFU), na área de Medicina Veterinária Preventiva, no período de 08 de abril a 18 de junho de 2019, perfazendo um total de 400 horas, sob supervisão do Prof^ª. Dra. Anna Monteio Correia Lima responsável, pela disciplina de Doenças Bacterianas dos Animais Domésticos e coordenadora técnica do Laboratório de Doenças Infecciosas da Universidade Federal de Uberlândia.

A disciplina do estágio curricular obrigatório é importante para o desenvolvimento profissional do aluno, tendo a oportunidade de praticar os conhecimentos obtidos durante a graduação e ter contato com a área de interesse dentro da Medicina Veterinária. A escolha da área de estágio partiu devido a afinidade com a Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública que são essenciais, pois, se ocupam da promoção, proteção e vigilância da saúde dos animais e seres humanos.

O local de estágio foi escolhido pelo fato do laboratório dispor de uma estrutura física que permitiu o acompanhamento da rotina laboratorial, no diagnóstico de doenças infectocontagiosas, que foi possível por possuir corpo profissional adequado. Outro fator de igual importância para essa escolha foi a necessidade de formar uma opinião crítica, principalmente, sob os diferentes meios diagnósticos de doenças infectocontagiosas usados na instituição escolhida para o estágio, tendo em vista, a disponibilidade de seus recursos e caso esta atendesse as expectativas, futuramente seria cogitado como um local para pleitear uma das vagas do seu programa de residência na área de Medicina Veterinária Preventiva devido à magnitude do mesmo para o aprimoramento profissional.

Neste relatório serão apresentadas sucintamente as atividades realizadas no laboratório de doenças infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia, com ênfase no diagnóstico de leptospirose utilizando a técnica indireta do Teste de Aglutinação Microscópica (MAT) e também uma breve revisão de literatura sobre as características do agente *Leptospira* spp., sua epidemiologia, sinais clínicos, prevenção e controle e posterior discussão frente a literatura vigente.

2 LOCAL DE ESTÁGIO

A estrutura do Laboratório de Doenças Infecciosas está inserida no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal Uberlândia (DPMV-UFU), localizado no Campus Umuarama, Avenida Ceará, Bloco 2D, sala 33, setor Umuarama, município de Uberlândia, estado de Minas Gerais (Figura 1A, 1B). O funcionamento é de segunda à sexta feira, das 7:00 da manhã às 18:00 da tarde. O laboratório oferece exames de apoio diagnóstico, além do desenvolvimento de projetos de pesquisa de mestrado e doutorado na área de concentração em Ciências Veterinárias.

A estrutura física do laboratório é constituída por uma sala de cultura, (Figura 2A), uma sala de lavagem e esterilização de material contaminado (Figura 2B), uma sala de lavagem e esterilização de material não contaminado (Figura 3A), uma sala de microscopia, (Figura 3B). Possui ainda uma sala de estudos com bancadas de uso comum para exames de rotina, (Figura 4A). Possui também uma sala para técnicas moleculares, e uma capela de fluxo laminar apenas para a montagem de mix para o uso em Reação em cadeia da polimerase (PCR) (Figura 4B) e uma sala de apoio administrativo.

O Laboratório de Doenças Infectocontagiosas tem como equipe a docente Dra. Anna Monteiro Lima (coordenadora), Lara Reis Gomes (Técnica de laboratório e Doutoranda do programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias da UFU), duas residentes de primeiro ano e duas residentes de segundo ano do programa de residência Uniprofissional em Medicina Veterinária, Área de concentração Medicina Veterinária Preventiva da UFU, além de doutorandas do Programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias da UFU.

Figura 1 - Estrutura física do Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia-UFU- Uberlândia- MG, 2019.



A) Entrada do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva. B) Entrada do Laboratório de Doenças Infectocontagiosas. Fonte: autor, 2019.

Figura 2 -Estrutura física do Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia-UFU- Uberlândia- MG, 2019.



A) Sala de cultura. B) Sala de lavagem e esterilização de material contaminado. Fonte: autor, 2019.

Figura 3 –Estrutura física do Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia-UFU- Uberlândia– MG, 2019.



A) Sala de lavagem e esterilização de material não contaminado. B) Sala de microscopia.

Fonte: autor, 2019

Figura 4 – Estrutura física do Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia-UFU- Uberlândia– MG, 2019.



A) Sala de estudos e bancadas de uso comum para exames de rotina. B e C) Sala para técnicas moleculares, e uma capela de fluxo laminar apenas para preparo do mix para o uso em Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Fonte: autor, 2019

3 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

As atividades desenvolvidas durante o estágio curricular obrigatório consistiram em lavagem e esterilização de materiais biológicos e não biológicos, coleta de espécimes clínicas, preparação de meios, cultura e antibiograma de amostras biológicas (swab de orelha externa, urina, secreções, feridas, leite entre outras) que consiste no cultivo de agentes infecciosos em meio próprio, que permite a nutrição, o crescimento e a multiplicação. Após a identificação de tais micro-organismos, foi realizado o antibiograma, uma vez que este contribui de maneira direta para a escolha do antibiótico ideal. Ainda foi realizada sorologia de Leptospirose por meio do MAT, cultura e repique de cepas de *Leptospira* spp., coleta de materiais e realização de testes de imunocromatografia que são testes de triagem para o diagnóstico de doenças através da detecção de antígenos ou anticorpos para cinomose, parvovirose, coranovirose, vírus da imunodeficiência felina (FIV), vírus da leucemia felina (FeLV) e brucelose. Além de visitas técnicas nas fazendas experimental Glória e Capim Branco para a vacinação de novilhas contra Brucelose.

A quantidade de exames realizados durante o período de estágio está apresentada nas tabelas 1 e 2, sendo o ensaio imunocromatográfico o mais solicitado, destacando o Vírus da imunodeficiência felina (FIV) e o Vírus da leucemia felina (FeLV) como os mais testados.

Tabela 1- Exames acompanhados no Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU)- MG- durante o período de 08/04/2019 à 18/06/2019.

Exame	Quantidade
Teste de Aglutinação Microscópica	62
Cultura e Antibiograma	29
Ensaio Imunocromatográficos	139

Fonte: Sistema de registro Ladoc, 2019.

Tabela 2. Diagnóstico de ensaios imunocromatográficos acompanhados no Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) MG- 2019.

Exame	Quantidade	Positivos	Porcentagem dos Positivos (%)
Cinomose	31	7	22.58
Parvovirose	13	12	92,31
Coronavirose	13	1	7.69

continua

Tabela 2. Diagnóstico de ensaios imunocromatográficos acompanhados no Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) MG- 2019.

			<i>conclusão</i>
FIV*	41	5	12,19
FeLV**	41	10	24,39

*Vírus da imunodeficiência felina (FIV). ** Vírus da leucemia felina (FeLV).

Fonte: Sistema de registro Ladoc, 2019.

Apesar do maior número de exames ter sido realizado para imunocromatografia, o interesse pelas zoonoses, fez com que a ênfase deste trabalho fosse a leptospirose, além de ser uma enfermidade que pode acometer várias espécies e trazer prejuízos para diversos seguimentos em que atua o médico veterinário. No âmbito da produção, por exemplo, ela é capaz de gerar baixos índices produtivos, afetando significativamente o setor agropecuário e, para a saúde pública, ela é uma importante zoonose, trazendo riscos à saúde humana e a dos animais de companhia (ECKSTEIN et al., 2017)). Assim, será apresentada uma revisão de literatura, descrição da metodologia para realização do MAT durante o estágio e a discussão.

4 LEPTOSPIROSE

4.1 Revisão de Literatura

A leptospirose é uma doença infectocontagiosa, que acomete os animais e os seres humanos sendo um sério problema para a saúde pública, de caráter zoonótico e é causada por uma bactéria do gênero *Leptospira* (FIGUEREDO et al, 2001; SONJA et al., 2014).

A doença foi descrita pela primeira vez em 1880, no Cairo, por Larrey; no entanto somente em 1886 que a leptospirose humana foi detalhada por Weil, depois de observar, quatro pacientes com sintomas de febre, icterícia e hemorragias, com comprometimento hepático e renal, sendo assim seu nome ainda hoje associado às formas graves da doença, denominada Síndrome de Weil (BRASIL, 1995).

A enfermidade ocorre principalmente em regiões com temperatura e umidade elevadas, condições ambientais essas ideais para crescimento e sobrevivência do agente etiológico. Trata-se de uma enfermidade de caráter sazonal com maior ocorrência nas estações do ano verão e/ou outono. No Brasil costuma ocorrer em surtos, principalmente em períodos com maior concentração de chuva, pois altos índices pluviométricos favorecem a ocorrência de enchentes, solos encharcados e lamas, que propiciam a sobrevivência da bactéria no ambiente, e sua disseminação (BRASIL, 2007).

Fatores socioeconômicos, como a falta de saneamento básico e o crescimento desordenado de comunidades, encontrados em algumas regiões do Brasil, quando associados ao clima tropical, altas taxas de umidade e elevadas temperaturas, favorecem a ocorrência das epidemias como a leptospirose (VASCONCELOS et al., 2012). Nas cidades os principais reservatórios e transmissores da leptospirose para os seres humanos são os cães e o rato do esgoto (RIBEIRO et al., 2003).

As leptospiras participam de um ciclo envolvendo seus hospedeiros primários, os roedores e animais selvagens, e a partir deles alcançam os hospedeiros secundários, animais sinantrópicos e ou domésticos. Essa enfermidade pode ter curso agudo ou crônico, sua patogenicidade depende do sorovar infectante e da susceptibilidade do hospedeiro (HAJIKOLAEI et al., 2005).

4.2 Etiologia

Leptospira spp. são bactérias gram-negativa, apresentam-se em forma de hélice, possuem um órgão locomotor de nome endoflagelo que são essenciais para sua motilidade, com isso ela consegue se movimentar mesmo em meios viscosos (PICARDEAU, 2013; PICARDEAU, 2017). Fazem parte do filo das espiroquetas, ordem SPIROCHAETALES, família LEPTOSPIRACEAE, 24 espécies estão listadas na List of prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) dentro do gênero *Leptospira*, uma em reclassificação (*L. parva*), agrupadas em 24 sorogrupos com mais de 300 sorovares (FOUTS et al., 2016; PICARDEAU, 2017; PUCHE et al., 2017; LPSN, 2019; EUZÉBY, 2019)

As leptospirosas estão divididas sorologicamente em dois grupos, sendo um grupo das patogênicas e outro das não-patogênicas (saprófitas), porém, alguns pesquisadores definiram filogeneticamente um terceiro grupo, denominado intermediário que possuem características distintas das espécies de caráter patogênico e não-patogênicas (saprófita), sua patogenicidade ainda não está clara (PICARDEAU, 2014).

A persistência de focos da leptospirose pode ser justificada através de características do próprio agente etiológico, como a elevada variação antigênica, a variedade de animais susceptíveis à infecção e a capacidade de sobrevivência do mesmo no meio ambiente (BRASIL, 2009).

4.3 Características do micro-organismo

Possuem forma helicoidal, são móveis, flexíveis, possuem dois flagelos responsáveis por sua movimentação em rotação e medem normalmente de 0,1 a 0,15 μm de espessura por 6,0 a 12,0 μm de comprimento. Uma das principais características das leptospirosas são os ganchos encurvados que auxiliam na movimentação em ambientes aquosos ou mesmo de consistência gelatinosa (GREENE et al. 2006; ADLER, 2015).

São bactérias aeróbias e fastidiosas, sua multiplicação é em temperatura de 28° a 30°C e em pH compreendido entre 7,2 e 7,4. Em cultivo em laboratório, não utilizam açúcares ou aminoácidos como combustível energético (PICARDEAU, 2013; SILVA et al., 2015).

4.4 Epidemiologia e saúde pública

A leptospirose é uma zoonose distribuída mundialmente em ambientes urbanos e rurais, em climas tropicais e temperados. Fatores como o crescimento desordenado da população em situação de extrema pobreza sem assistência higiênico-sanitária e serviço de saúde, associado a desordens climáticas como chuvas fortes, contribuem para maior disseminação dessa doença (ADLER & MOCTEZUMA, 2010; PICARDEAU, 2013; SANCHÉZ, 2015).

A leptospirose tem sua relevância em saúde pública especialmente em países em desenvolvimento devido às deficiências no saneamento básico, o que afeta populações vulneráveis como produtores rurais e moradores de setores urbanos precários (IZIRUIETA et al., 2008). Estima-se que exista uma incidência anual mundial de 1,03 milhões de casos clínicos em seres humanos e 58.900 mortes, o que coloca a leptospirose como a zoonose mais disseminada em todo mundo e a principal causa de doenças em muitas espécies de animais domésticos (ADLER, 2015; COSTA et al., 2015).

No Brasil, de 2001-2009, foi registrada uma média de 13474, 9 notificações anuais de casos de leptospirose humana com letalidade de 10,8%, e no ano de 2007 somente os custos hospitalares somaram o total de US\$ 439.956,47 e não existe ainda vacina disponível para uso em seres humanos (FIOCRUZ, 2007.; SOUZA et al., 2011; VASCONCELOS et al., 2012). Faz-se necessário bom conhecimento da epidemiologia da leptospirose humana, pois apesar de ser uma doença de notificação compulsória, é pouco diagnosticada, com a detecção dos reservatórios animais envolvidos, das cepas e sorovares circulantes, dos padrões sazonais e geográficos, aspectos eco-epidemiológicos e das populações específicas de risco, que podem ser determinados pela vigilância epidemiológica e subsidiar estratégias de intervenção e prevenção (GOARANT, 2016; LANGONI et al., 2017; ROST, 2018).

A infecção leptospírica quando em hospedeiros de manutenção ou também denominados de hospedeiros preferenciais, na maioria das vezes não é capaz de causar a leptospirose ou se manifesta de forma subclínica, nesses hospedeiros ocorre colonização renal por um longo período, promovendo disseminação ambiental. Já nos hospedeiros acidentais, a doença se manifesta de forma grave, evidenciando os sinais clínicos e a colonização renal é rápida, por isso é importante diferenciar infecção por *Leptospira spp.* de leptospirose (ROJAS et al., 2010; LUCHEIS; FERREIRA JUNIOR, 2011).

A infecção pelas leptospiros ocorre principalmente no período das chuvas, pois favorece a sobrevivência do agente no ambiente, ajudando a transmissão para o hospedeiro de manutenção, como os roedores, destacando as espécies *Rattus norvegicus*, *Rattus rattus* e *Mus musculus*, sendo ratazana do esgoto, rato do telhado e camundongo, respectivamente (SARKAR et al., 2002; IVANOVA et al., 2012)

Na cadeia epidemiológica da leptospirose a fonte de infecção é um animal infectado e os hospedeiros de manutenção são os principais responsáveis pela contaminação ambiental. Portanto, para a prevenção da saúde pública e saúde animal, medidas de controle nas espécies preferenciais, devem ser consideradas. A principal via de eliminação de *Leptospira* spp. é a urina, no entanto o contato direto com vísceras, sangue, e o contato indireto com o solo e água contaminada também pode levar à infecção (WONG et al., 2012; WYNWOOD et al., 2014). As portas de entrada são a pele intacta, quando exposta em período prolongado sob a água e a pele com ferimentos, bem como via mucosa oral, da garganta ou esôfago, e mucosas conjuntival e nasal, porém, *Leptospira* spp. não resiste ao pH estomacal (EVANGELISTA; COBURN, 2010; ASOH et al., 2014; POLACHINI; FUJIMORI, 2015).

A resposta imune é específica para cada sorogrupo de *Leptospira* spp., portanto não há reações cruzadas entre sorogrupos diferentes e a bactéria pode persistir nas células epiteliais dos túbulos renais, causando eliminação urinária durante anos (HARTMANN et al., 2013).

4.5 Patogenia e sinais clínicos

A leptospiremia normalmente dura sete dias e é resultante da exposição das mucosas às bactérias provocando a infecção com quadro clínico leve ou imperceptível. Na fase de leptospiremia as bactérias se multiplicam no fígado e rins, devido à elevada concentração de ácidos graxos, que posteriormente serão metabolizados por β -oxidação para seu crescimento provocando lesão no endotélio de pequenos vasos, podendo evoluir para isquemia local e necrose dos túbulos renais e hepatócitos, lesões pulmonares, meningite e placentite (ADLER, MOCTEZUMA, 2010; SMYTHE et al., 2013).

Os hospedeiros acidentais desenvolvem a fase aguda da doença, presente em infecções caracterizada por icterícia e hemoglobinúria. Os cães podem apresentar insuficiência renal aguda ou crônica e hepatite crônica, já os equinos apresentam quadros de uveítes ou cegueiras em animais jovens. Na fase crônica em bovinos e ovinos, ocorre principalmente abortamentos, natimortos, recém-nascidos fracos e/ou prematuros, infertilidade e agalactia em adultos comumente quando a infecção é causada por sorovares adaptados à espécie (ADLER; MOCTEZUMA, 2010; EVANGELISTA; COBURN., 2010).

As lesões renais têm relação com a capacidade das espiroquetas de parasitar os túbulos renais proximais dos rins dos hospedeiros e a disseminação ocorre quando as bactérias são eliminadas pela urina, denominada fase de leptospinúria, contaminando o ambiente, podendo infectar outros animais por contato direto com a urina ou água contaminada (EVANGELISTA; COBURN., 2010).

4.6 Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial da leptospirose é necessário devido a inespecificidade e a diversidade dos sinais clínicos, tornando difícil a identificação por meio do diagnóstico clínico. Para o diagnóstico da infecção deve relacionar os sinais clínicos, as evidências epidemiológicas e os resultados de exames laboratoriais. Geralmente, a doença é detectada por métodos laboratoriais de sorologia, através de anticorpos que possam estar presentes no sangue, após cinco a sete dias depois do aparecimento dos sinais clínicos (OLIVEIRA, 2012).

O diagnóstico laboratorial é realizado por métodos diretos ou indiretos, os métodos diretos consistem na pesquisa do agente etiológico, que incluem a visualização na urina fresca em campo escuro, em histopatologia de tecidos acometidos e visualizados em microscopia de luz, detecção do DNA pelo método de PCR ou a cultura e isolamento de *Leptospira* spp.. Já os

métodos indiretos baseiam-se na detecção de anticorpos específicos, podendo ser realizados pelos testes de MAT (MAT), imunofluorescência indireta e *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (FREITAS et al., 2005; MATPAIO et al., 2011).

O método diagnóstico de escolha depende do estágio da infecção. No início da infecção podem ser utilizados os testes para detecção da *Leptospira* spp. por meio de cultura, testes moleculares, e microscópicos. Já em uma fase mais avançada da infecção utiliza-se testes de detecção de anticorpos (OLIVEIRA, 2012).

O MAT é o exame mais empregado em estudos epidemiológicos para o diagnóstico de leptospirose, recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como teste padrão-ouro e consiste na reação de antígenos e anticorpos fornecendo o provável sorovar infectante. Os soros de indivíduos com títulos positivos geralmente apresentam reações cruzadas a uma variedade de sorovares, o que dificulta a confirmação do sorovar infectante (ANZAI, 2006; HARTMANN et al., 2013).

De acordo com Galvão (2009) pode ocorrer também reações paradoxais, no qual um animal infectado por um sorovar pode apresentar títulos altos de anticorpos a um sorovar que não é o infectante. Títulos de 100 na fase aguda e 800 na fase de convalescença, para o mesmo sorovar, é sugestivo de que a doença seja causada por esse sorovar. O método tem como desvantagem a utilização de leptospirosas vivas e a insensibilidade de detectar anticorpos antes da segunda semana de doença. É necessário considerar dados epidemiológicos, anamnese e o exame físico do animal, títulos vacinais e o início da fase aguda, que podem interferir no resultado (HAGIWARA et al. 2004; HARTMANN et al., 2013; HAGIWARA et al., 2015).

4. 7 Prevenção e controle

O controle da leptospirose nos animais domésticos envolve a aplicação de medidas que incluem a identificação das fontes de infecção, o controle no momento da aquisição de animais e a imunização sistemática dos susceptíveis com vacinas inativadas que contenham as sorovarietades de leptospirosas presentes na região (MELO et al 2010). Outras medidas profiláticas são o acondicionamento e destino adequado do lixo e o armazenamento apropriado de alimentos. (BRASIL 2009).

Além disso, a implementação de medidas de controle tais como investimentos no setor de saneamento básico com melhoria das condições higiênico-sanitárias da população e educação ambiental, auxiliariam na diminuição do potencial zoonótico desta enfermidade. Medidas de prevenção para exposições ocupacionais devem considerar a utilização adequada

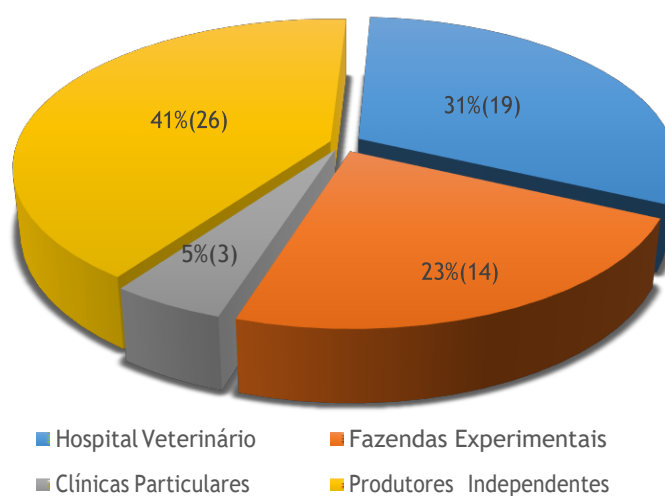
de equipamentos de proteção individual (EPI's), como luvas, botas e outras vestimentas de acordo com o âmbito profissional (BRASIL, 2009).

A vacinação animal desempenha um importante papel no controle da leptospirose capaz de reduzir os portadores renais e conseqüentemente, o risco de infecção para os tratadores, especialmente quando acompanhada de programas educacionais e de higiene nas comunidades com o apoio das autoridades responsáveis pela saúde pública. Destaca-se que o sucesso dos programas de vacinação depende de estudos epidemiológicos contínuos para monitorar a ocorrência de diferentes sorovarietades de leptospiras em uma população. O controle de cães errantes é essencial, pois pode contribuir para a manutenção, distribuição e transmissão da doença (VASCONCELOS et al., 2012; GOMES, 2015).

4.8 Diagnóstico de Leptospirose pelo Teste de Aglutinação Microcópica no Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia

Durante o estágio foram recebidas 62 amostras de sangue para realização do exame de leptospirose provenientes das fazendas experimentais da Universidade Federal de Uberlândia, de clínicas particulares, de produtores independentes e do Hospital Veterinário com objetivo de confirmar diagnóstico e realizar o tratamento adequadamente (Gráfico 1).

Gráfico 1- Quantidade de exames de leptospirose realizados no Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), MG, conforme a origem, no período de 08/04/ 2019 à 18/06/2019.



Fonte: Sistema de registro Ladoc, 2019.

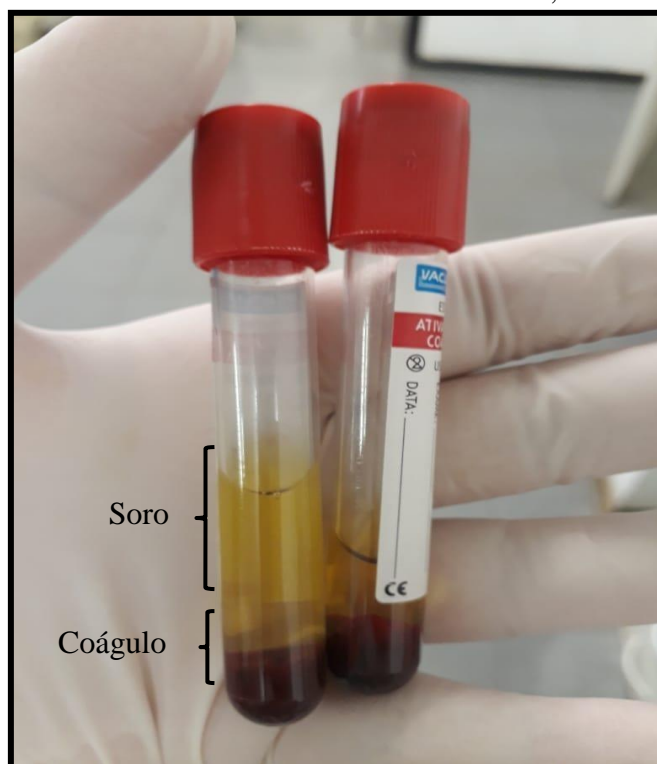
Para cada solicitação foi preenchida uma ficha de recepção, em que constavam dados referentes à propriedade, proprietário, Médico(a) Veterinário(a) solicitante, animal, espécie, exame, quantidade de exame e número da ficha clínica (Anexo 1) na qual o proprietário ou solicitante descrevia qual exame desejaria que se realizasse, mediante pagamento. E por último, após a realização do exame, foram registradas no livro de exame (livro de registro de Leptospirose), onde as amostras foram identificadas, com data de colheita, lote, n° de registro, identificação (brinco, nome, números da ficha clínica etc.) sexo, espécie, proprietário ou propriedade, resultado de triagem e titulação.

O laboratório orientava a coleta de sangue e que este deveria ser coletado em tubo sem anticoagulante, centrifugado (Figura 5) e transferido o soro para tubo (tipo “Eppendorf”).

Se fosse utilizado tubo com gel separador, a orientação era centrifugar o sangue no mínimo cinco minutos após a colheita e no máximo duas horas e enviar o soro no próprio tubo.

Assim, o laboratório recebia amostras de soro ou do próprio sangue para posterior separação do soro, caso não fosse possível a centrifugação prévia

Figura 5- Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia-UFU- Uberlândia– MG, 2019.



Separação do sangue total em soro e coágulo após centrifugação.
Fonte: autor, 2019.

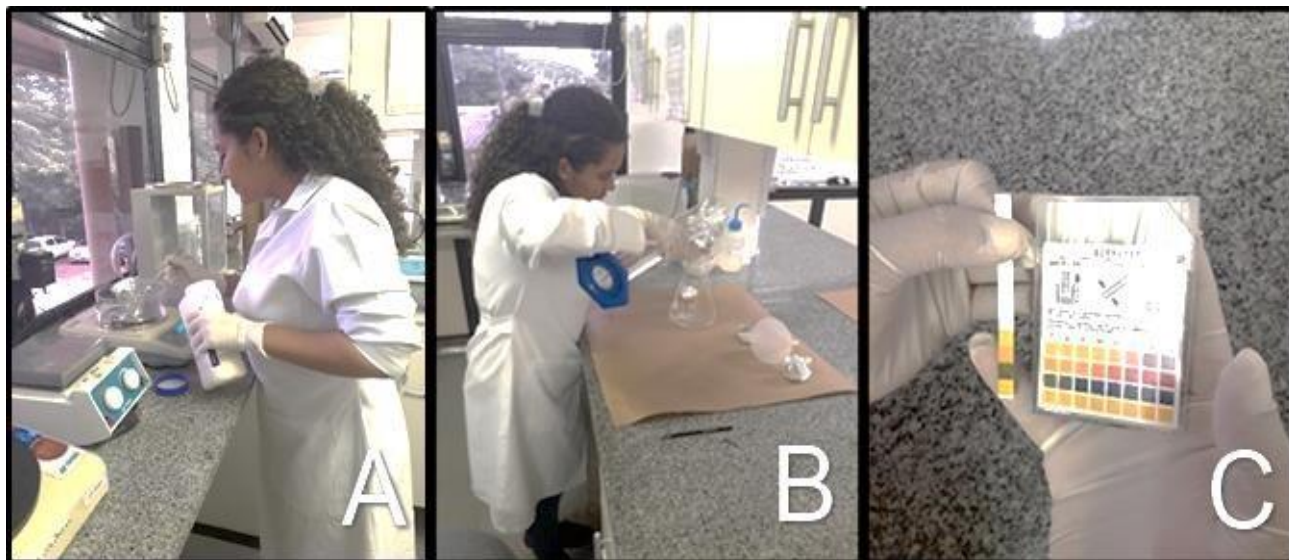
4.9 Preparo de meio de cultura para *Leptospira* spp.

No laboratório são utilizados dois meios para o cultivo de *Leptospira* spp. O meio Fletcher semissólido em que são cultivadas as cepas-mães, com repique realizado a cada três meses, utilizado na ocorrência de eventual problema, seja de natureza biológica, física ou química das cepas usadas no requipe semanal. E o meio Ellinghausen-Mac Cullough-Johnson-Harris (EMJH), com repique realizado semanalmente, neste são mantidos os antígenos que serão diluídos para a realização da MAT.

Inicialmente foi realizado o preparo da solução de EMJH (2,3 gramas de DIFCO™® *Leptospira* Medium Base EMJH em 900ml de água destilada) (Figura 6A, B), com medição do pH usando tiras medidoras de pH, certificando-se de estar entre 7 e 8 (Figura 6C). A solução

foi esterilizada na autoclave por 15 minutos. O meio Fletcher foi preparado a partir do meio HIMEDIA® Fletcher Leptospira Medium Base (2,5 gramas em 920 ml de água destilada) e autoclavado por 15 minutos.

Figura 6– Preparação do meio Ellinghausen-Mac Cullough-Johnson-Harris (EMJH) no Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia-UFU- Uberlândia-MG, 2019.



A) pesagem do meio; B) diluição do meio EMJH em água destilada; C) fita de medição do pH da solução com pH. Fonte: autor, 2019.

Os meios foram enriquecidos com soro de coelho estéril, adquirido em frasco de 400 ml (marca CRIPION®), inativando-o em banho maria na temperatura de 56°C por 60 minutos, virando de 15 em 15 minutos (Figura 7A, B), em seguida fracionado em tubos Falcons (10, 20, 30, e 40ml) (Figura 8) e posteriormente congelados, para facilitar a logística, uma vez que seriam usados semanalmente a cada repique, para realizar o teste de triagem e titulação para leptospirose.

No momento do enriquecimento dos meios de cultura, o soro de coelho foi descongelado em temperatura ambiente, centrifugado em 3000 rpm, durante 45 minutos em temperatura de 25°C. Em seguida, a manipulação ocorreu em capela de fluxo laminar, com posterior adição de 10% de soro de coelho filtrado ao meio EMJH usando uma membrana filtrante Mis. Est. ME 24, 0,2 µm, ø 47mm da marca Schleicher & Schuell® (Figura 10) e/ou Fletcher, e levado a estufa de cultura microbiológica por 24 horas para prova de esterilidade em de temperatura de 35°C.

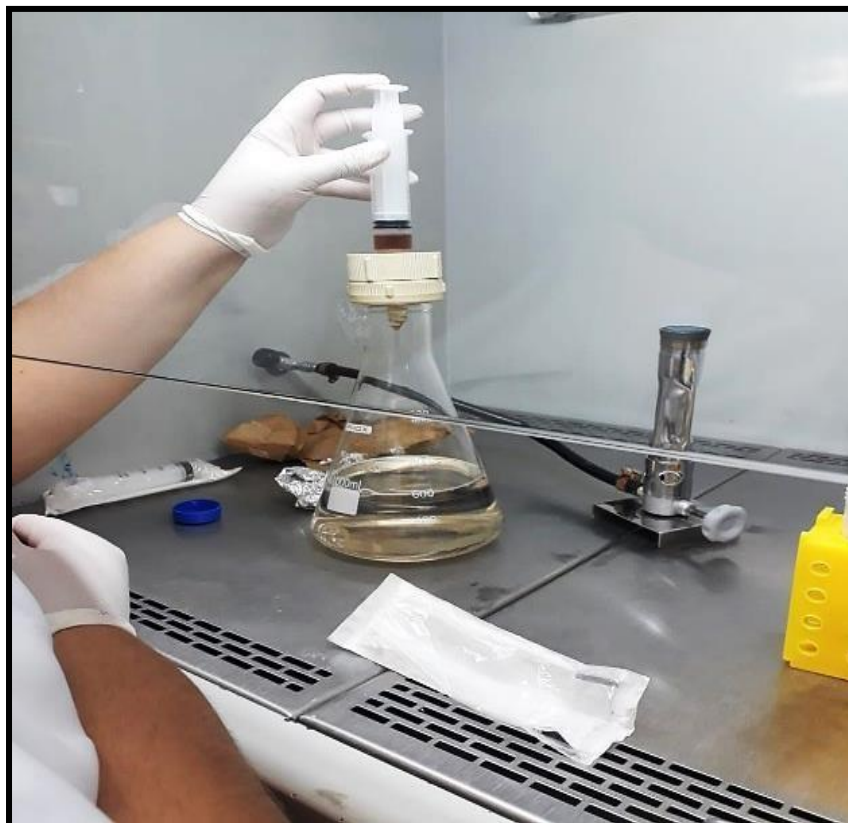
No laboratório, o meio EMJH foi mantido em duplicatas dos 22 soros variantes como reserva (antígeno e mais manutenção). Os antígenos foram conservados em meio EMJH, até o momento do uso, quando foi utilizado o meio EMJH enriquecido.

Figura 7–Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia-UFU- Uberlândia– MG, 2019. Soro de coelho estéril CRIPION® em banho maria.



Fonte: autor, 2019

Figura 8– Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia-UFU Uberlândia– MG, 2019. Filtragem do soro de coelho e adição ao meio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH)



Fonte: autor, 2019.

5 Manutenção e repique das leptospiras

O Laboratório de Doenças infectocontagiosas da UFU mantém 22 sorovares (Quadro 1), que foram gentilmente cedidas pela Universidade Federal Fluminense (UFF), para utilização como antígeno na prova de MAT (MAT).

Quadro 1 – Laboratório de Doenças infecciosas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), MG - 2019. Código, sorogrupo e variante sorológica das *Leptospira* spp. utilizadas na rotina.

Código	Sorogrupo	Sorovar
1 A	Australis	Australis
2 B	Autumnalis	Autumnalis
3 C	Bataviae	Bataviae
4 D	Bataviae	Brasiliensis
5 E	Australis	Bratislava
6 F	Canicola	Canicola
7 G	Ballum	Castellonis
8 H	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni
9 I	Cynopteri	Cynopteri
10 J	Djasiman	Djasiman
11 L	Grippotyphosa	Grippotyphosa
12 M	Sejroe	Guaricura
13 N	Sejroe	Hardjoprajitino
14 O	Hebdomadis	Hebdomadis
15 P	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae
16 Q	Javanica	Javanica
17 R	Panamá	Panama
18 S	Pomona	Pomona
19 T	Sejroe	Sejroe
20 U	Shermani	Shermani
21 V	Tarassovi	Tarassovi
22X	Sejroe	Wolffi

Fonte: Sistema de registro Ladoc, 2019.

Durante o estágio o repique para a manutenção dos antígenos foi acompanhado e realizado semanalmente da seguinte maneira: em fluxo laminar, retiravam-se 10 mL da solução EMJH enriquecida (EMJH + soro de coelho) preparada anteriormente e dispersos em

tubos, sendo dois tubos para cada sorovar; em um tubo foi colocado 0,5 ml de leptostira e no outro 0,3 ml, quantidade essa retirada dos tubos de manutenção em meio EMJH. Ao término do repique os tubos foram mantidos em estufa a 28 – 30°C para o desenvolvimento das leptospiras (figura 9).

Figura 9– Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia-UFU- Uberlândia– MG, 2019. Sorovares de *Leptospira* spp. mantidos em estufa BOD sob T° 28 °C



Fonte: autor, 2019.

5.1 Teste de Aglutinação Microscópica (MAT) para Triagem

Na sorologia é feita a pesquisa de anticorpos séricos específicos contra uma coleção de antígenos vivos dos diferentes sorogrupos de leptospira, sendo esse exame o mais utilizado na rotina. De acordo com estudos epidemiológicos realizados na região, o laboratório usa para diagnóstico de leptospira, os sorovares listados no quadro 2, tanto na triagem como na titulação.

Antes de realizar o teste de triagem foi calculada a quantidade de antígeno necessária, multiplicando-se 50 µL de cada sorovar pelo número de amostras a serem testadas. A triagem trata-se de promover a junção dos antígenos (sorovares) com o soro do animal e observar a aglutinação das amostras reagentes. Retirava-se 50µ do soro do animal e em seguida realizava-

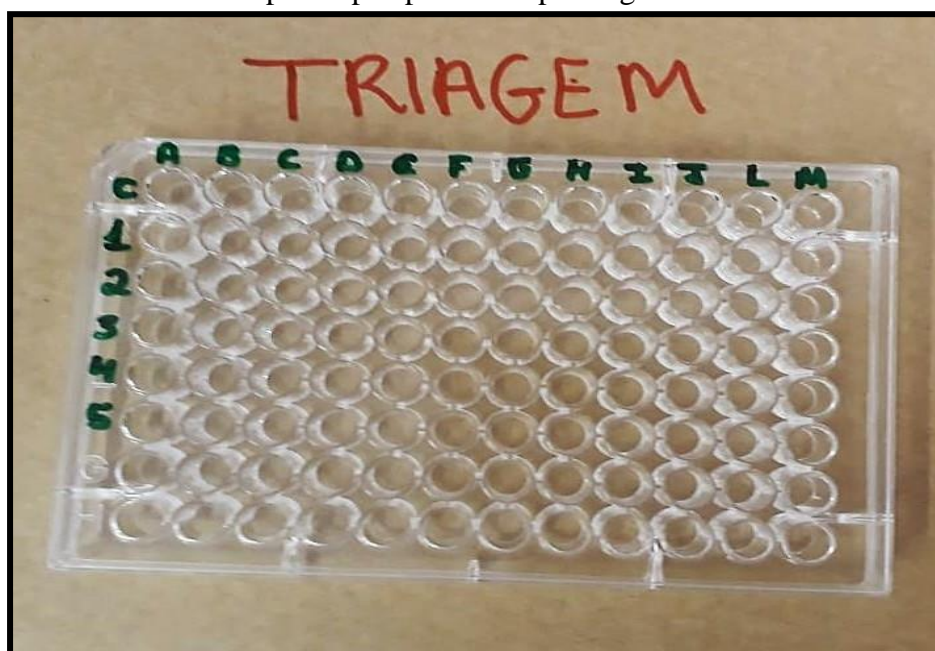
se diluição em 2,45 ml de solução salina a 0,85% (diluição 1:50, sendo uma parte de soro sanguíneo para 49 partes de solução salina 0,85%), em seguida, em placas de ensaio sorológico, foi realizada a identificação do controle negativo (C) e das amostras na vertical (1, 2, 3, 4, ...) e na horizontal a letra dos sorovares de A a M (Figura 10).

Quadro 2. Sorovares usados para o exame Teste de Aglutinação Microscópica (MAT) contendo um representante de cada sorogrupo mais prevalente na região, nas etapas de triagem e titulação. - Universidade Federal de Uberlândia- UFU 2019.

Letra	Sorogrupos	Sorovares
A	Australis	Bratislava
B	Canicola	Canicola
C	Ballum	Castellonis
D	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni
E	Djasiman	Djasiman
F	Grippotyphosa	Grippotyphosa
G	Sejroe	Hardjoprajitino
H	Hebdomadis	Hebdomadis
I	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae
J	Pomona	Pomona
L	Tarasovi	Tarasovi
M	Sejroe	Wolffi

Fonte: Sistema de registro, Ladoc, 2019.

Figura 10– Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia-UFU- Uberlândia- MG, 2019. Placa para o exame Teste de Aglutinação Microscópica (MAT) para leptospira na etapa triagem.

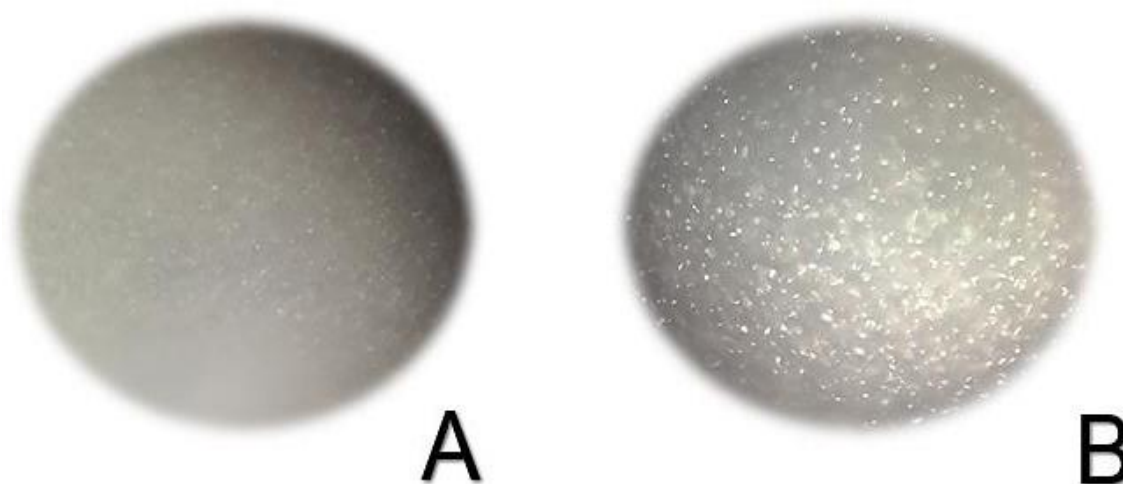


Fonte: autor, 2019.

Nos poços do controle foram colocados 50 μ de solução salina mais 50 μ de cada sorovar. Nos poços das amostras foram colocados 50 μ da solução de 1/50 mais 50 μ de cada sorovar resultando numa diluição 1:100 considerada ponto de corte para o animal adulto ser reagente. Em seguida aguardava-se por uma hora, em temperatura ambiente conforme técnica adaptada do Manual de Leptospirose (BRASIL, 1995), descrita por Santos (2007).

Após uma hora foi realizada a leitura das placas em microscópio de campo escuro (Z- modelo Carl Zeiss MicroImaging GmbH ®), observando-as na objetiva de 10X e ocular de 10X Os soros que apresentaram 50% ou mais de aglutinação foram considerados positivos e submetidos a titulação para cada sorovar a que foi reagente, pelo exame de uma série de diluições geométricas de razão dois (Figura 11).

Figura 11– Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia-UFU- Uberlândia– MG, 2019. Leitura do Teste Aglutinação Microscópica (MAT).



A) Resultado negativo. B) Resultado positivo.

Fonte: autor, 2019.

Durante o estágio, 62 amostras foram testadas no MAT dentre elas 11 foram reagentes na triagem (Tabela 3).

Tabela 3. Teste de aglutinação microscópica etapa triagem realizada para diagnóstico de Leptospirose na Universidade Federal de Uberlândia (UFU) no período de 08/04/2019 à 18/06/2019.

Espécie	Quantidade	Reagente	Porcentagem de Reagentes (%)
Bovina	26	7	26,92
Ovina	14	0	0
Canina	22	4	18,18

Fonte: Sistema de Ladoc, 2019.

5.2 Teste de Aglutinação Microscópica (MAT) para Titulação

Inicialmente foi calculada a quantidade de antígeno necessária para realizar a etapa de titulação, em que 50 μL foi multiplicado por 5, devido ao número de titulações que são 5, sendo 1:200, 1:400 e 1:800 1: 1600 e 1:3200. Considera-se como reagentes as amostras que apresentam aglutinação na titulação $\geq 1:100$.

Após registrar para quais sorovares cada amostra foi reagente (1:100), realizava-se o teste de titulação. As amostras a serem tituladas foram diluídas ao dobro (1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 e 1:3200) e testadas até não haver mais aglutinações ou atingir o valor máximo da titulação no teste (1:3200) (Figura 12). A última diluição tituladora na qual ocorreu aglutinação foi considerada o título da amostra.

Figura 12–Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia-UFU- Uberlândia– MG, 2019.Placa para exame sorológico, Teste de Aglutinação Microscópica (MAT), etapa titulação.



Fonte: autor, 2019.

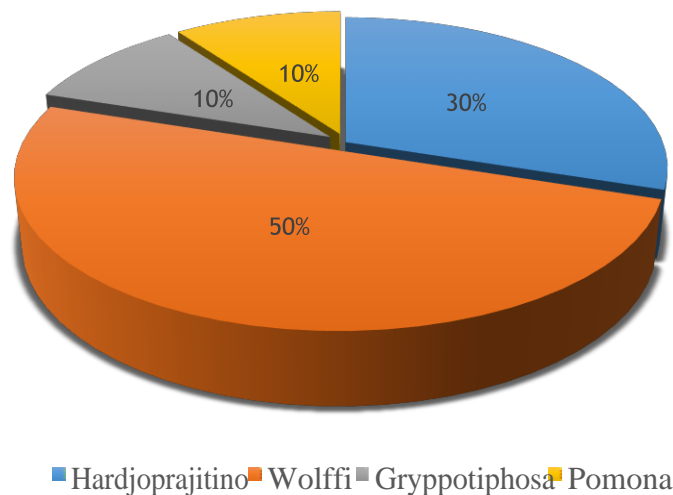
O MAT para titulação foi realizada colocando-se na placa de ensaio sorológico na horizontal, a letra correspondente ao sorovar reagente na triagem, na vertical identificou-se a titulação (1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200) utilizando-se 100 μL da solução salina a 0,85% no primeiro poço de titulação 1:200 e 50 μl nas demais titulações. Em seguida, foi pipetada 50 μl da solução 1:50 (50 μm do soro do animal mais 2,45ml de solução salina a 0,85%) e colocado no poço da titulação 1:200, assim homogeneizava e pipetava 50 μl da primeira titulação para a

segunda (1:400), repetindo de uma titulação a outra, descartando 50µl do poço da última titulação. Acrescentava-se 50µl do sorovar positivo em cada poço e em seguida aguardava-se por uma hora em temperatura ambiente e procedia com a leitura realizada em microscópio de campo escuro obedecendo os mesmos critérios da triagem.

O resultado positivo foi definido como a diluição do soro que mostrou pelo menos 50% de aglutinação, deixando 50% células livres comparadas com uma cultura de controle e diluída a 1/200. O resultado do teste foi relatado como a diluição final do soro do sorovar específico (por exemplo, *icterohaemorrhagiae* 1/100 ou 1/400).

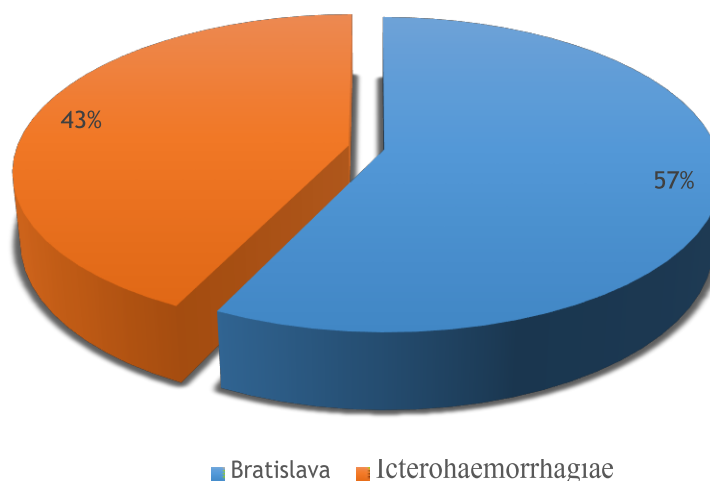
Dos exames realizados na espécie bovina, sete foram reagentes (Tabela 3) com as soroviedades *hardjo* e *wolffi* como as mais prováveis de infecção (Gráfico 3). Na espécie canina, o sorovar *bratislava* foi o mais prevalente (Gráfico 4) e para espécie ovina, apesar de ter sido testada, não reagiu em nenhuma amostra na titulação. A tabela 4 apresenta todos os sorovares de acordo com a espécie, que reagiram na triagem e suas respectivas titulações.

Gráfico 2- Porcentagem de bovinos reagentes para *Leptospira* spp. no Teste de Aglutinação Microscópica (MAT) de acordo com os sorovares encontrados no período de 08/04/2019 à 18/06/2019.



Fonte: Sistema de Ladoc, 2019.

Gráfico 3. Porcentagem de caninos reagentes para *Leptospira* spp. no Teste de Aglutinação Microscópica (MAT) de acordo com os sorovares encontrados no período de 08/04/2019 à 18/06/2019.



Fonte: Sistema de registro Ladoc, 2019.

Tabela 4. Sorovares reagentes de acordo com a espécie e suas respectivas titulações- Laboratório de doenças infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) no período de 08/04/2019 à 18/06/2019.

Animal	Espécies	Sorovar	Titulação
A1	Canina	Icterohaemorrhageae	1:600
		Bratislava	1:600
A2	Canina	Icterohaemorrhageae	1:400
		Bratislava	1:200
A3	Canina	Icterohaemorrhageae	1:1600
		Bratislava	1:800
A4	Canina	Bratislava	1:200
A5	Bovina	Grippotyphosa	1:100
		Wolffi	1:100
A6	Bovina	Hardjoprajitino	1:100
		Wolffi	1:100
A7	Bovina	Hardjoprajitino	1:100
		Wolffi	1:200
A8	Bovina	Hardjoprajitino	1:100
		Wolffi	1:200
A9	Bovina	Pomona	1:100
A10	Bovina	Wolffi	1:100
A11	Bovina	Wolffi	1:100

Fonte: Sistema de registro Ladoc. 2019

5.3 Discussão

O MAT é considerado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como teste padrão-ouro para diagnóstico laboratorial da leptospirose, desde que seja realizado na fase aguda da doença, quando as bactérias estão presentes na corrente sanguínea (leptospiemia) e convalescente (PEREIRA et al., 2018). Na rotina do laboratório o MAT é realizado na fase aguda e convalescente, se necessário repetido 15 a 20 dias após o primeiro exame, para identificar soroconversão ou aumento dos títulos das aglutininas.

Além do meio EMJH que é usado para manutenção do estoque dos antígenos utilizados no MAT e para o repique semanal e, do meio Fletcher semissólido que é usado na manutenção das cepas-mães no laboratório, diversos meios foram descritos no decorrer dos anos como o meio de Stuart, Kortoff, T80/40LH usados para multiplicação dos antígenos (ELLIS; MONTGOMERY; CASSELLS, 1985; GOMES 2015). De acordo com o estudo realizado por Silveira (2018), o meio líquido EMJH-base e o meio T80/40LH-base mostraram maior eficiência para manutenção e isolamento geral para as espécies *L. interrogans*, *L. noguchii*, *L. santarosai* e *L. borgpetersenii*.

O soro de coelho é importante para suplementação dos meios usados para o cultivo de leptospirosas, como fonte de ferro, cianocobalamina, albumina, ácidos-graxos e outros nutrientes, auxiliando no crescimento dos antígenos (VIEIRA, 2012). O soro de coelho estéril Cíprion, sofre inativação do seu sistema complemento evitando assim outras aglutinações que não sejam dos anticorpos do soro testado e as leptospirosas usadas no MAT, posteriormente fracionado em tubos falcons para facilitar a logística e evitar desnaturação de suas proteínas, pois o mesmo era descongelado para o uso nos repiques semanalmente.

A recomendação oficial para realizar o MAT aplicada à leptospirose é que a coleção de antígenos empregada contenha um representante por sorogrupo, sendo possível, por meio da realização de inquéritos sorológicos que exercem papel de relevância no controle da leptospirose, além do acréscimo de sorovares autóctones da região, que ampliaria a capacidade discriminadora do teste. (ELLIS, 2015). Essa mesma metodologia foi empregada para realização do MAT no laboratório, no entanto, pode ocorrer infecção por um sorovar não contemplado na lista dos antígenos usados e o animal ser considerado sem infecção.

Em Uberlândia- MG, Mendes et al. (2018) analisou a ocorrência de animais com anticorpos anti-*Leptospira* spp. na região nos anos de 2011 a 2014, verificando que 504 bovinos foram positivos e o sorogrupo mais reagente foi o Sejroe, com 347 animais reagentes ao sorovar Hardjo (68,85%) e 191 animais reagentes ao sorovar Wolffi (37,9%). Favero et al. (2001) analisou 4.487 amostras de rebanhos bovinos de corte na Região de Minas Gerais encontraram 87,3% de amostras sororreagentes a pelo menos um sorovar de *Leptospira* spp pelo MAT com as soroviedades Hardjo e Wolffi como as mais prováveis de infecção.

Figueiredo et al. (2009) analisaram 2.573 amostras do soro sanguíneo do Tocantins e verificaram que no MAT os sorovares Hardjo (65,6%) e Wolffi (12,3%) foram apontados como os mais prováveis de infecção. Castro (2013) realizou um estudo sorológico para detecção de anticorpos para *Leptospira* spp. pelo MAT, frente aos sorovares testados, em touros, na microrregião de Araguaína-TO destacando-se os sorovares Hardjo (44,2%) e Wolffi 40 (43,6%) que além de apresentarem-se com elevada frequência entre os animais, ambas estiveram presentes em 90% dos rebanhos pesquisados. De acordo com os estudos citados anteriormente, os sorovares prevalentes na espécie bovina em Minas Gerais, foram os mesmos prováveis de infecção no Tocantins.

Os sorovares encontrados na sorologia dos bovinos analisados no laboratório, foram Hardjoprajitno e Wolffi, como os bovinos são considerados hospedeiros de manutenção dos mesmos, o resultado da titulação foram títulos baixos. Gomes (2015) afirma que apesar do sorovar Hardjoprajitno estar adaptado aos bovinos, podem provocar sinais clínicos ligados a reprodução, como abortamentos, natimortos, bezeros fracos e infertilidade da vaca, além de queda brusca na produção leiteira, leite com coloração semelhante ao colostro com contagem celular alta, febre e anorexia.

De acordo com Bolin (2003) fatores como reações cruzadas de anticorpos, títulos de anticorpos induzidos por vacinação, incerteza entre os títulos de anticorpos e os indicativos de infecção ativa, dificulta a análise dos resultados dos testes sorológicos. O autor afirma que um animal infectado com um único sorovar pode ter anticorpos para mais de um sorovar no MAT caracterizando reação cruzada, que ocorre baseada nas proximidades antigênicas entre os sorovares do gênero *Leptospira* spp., no entanto, o sorovar infectante é considerado o que desenvolve maior título de anticorpos.

Relacionado a vacinação Bolin (2003) ainda destaca como exemplo, os bovinos que normalmente desenvolve baixa resposta vacinal e a mesma permanece por um a três meses após. Porém alguns animais desenvolvem altos títulos após a vacinação, que embora diminua com o tempo, pode persistir por mais de seis meses. Outro fator de igual importância é a

incerteza do que é significativo para o diagnóstico de leptospirose, o título de aglutinação igual ou superior a 100 é considerado positivo. Animais vacinados podem apresentar ponto de corte excessivo e o mesmo em hospedeiros de manutenção pode não ser alcançado.

Os hospedeiros de manutenção eliminam as bactérias na urina mesmo quando os títulos no MAT são inferiores ou iguais a 1:100. Portanto um título baixo de anticorpos não define o diagnóstico da leptospirose, baseado nos fatores citados anteriormente, o diagnóstico da leptospirose quando fundamentado em uma única amostra, deve ser realizado por profissionais competentes, considerando o quadro clínico e o histórico de vacinação do animal (BOLIM, 2003).

O resultado do MAT nas amostras de soro de ovinos enviadas ao laboratório foram todos soronegativos, alguns pesquisadores apontam uma possível resistência dos ovinos a doença, revelando através de estudos um menor número de soropositivos para ovinos em comparação a bovinos e búfalos, tal característica pode ser explicada pela rusticidade e resistência natural à infecção, atribuída a espécie ovina (COSTA et al., 2016; PIMENTA et al., 2019). Gomes (2015) aponta os sorovares Grippotyphosa, Serjroe, Icterohaemorrhagiae e Tarassovi como os mais prevalentes na espécie ovina.

De acordo com inquéritos realizados em diversas regiões do Brasil, os sorovares encontrados em cães foram: Icterohaemorrhagiae, Canicola, Pomona, Autumnalis, Grippotyphosa, Pyrogenes, Copenhageni e Bratislava. No presente estudo um dos sorovares reagentes no MAT foi o Icterohaemorrhagiae, o mesmo geralmente causa a síndrome ictero-hemorrágica, caracterizada por comprometimento hepático e renal que leva a icterícia e insuficiência renal aguda ou crônica podendo evoluir para óbito do animal (HAGIWARA et al., 2004).

Além dos sorovares Canicola e Icterohamorrhagiae, considerados por muitos pesquisadores como os mais prevalentes nos caninos, outros sorovares como o Pomona, Grippotyphosa e o Bratislava são detectados no cão, como o que aconteceu no presente estudo, no qual um dos sorovares isolados foi Bratislava, e a explicação pode ser pela proximidade do cão com animais silvestres considerados reservatórios ou com locais contaminados onde vivem os hospedeiros de manutenção dos sorovares que no caso pode ser os suínos (HAGIWARA et al., 2004).

No mercado brasileiro, encontram-se disponíveis vacinas polivalentes como a V12 composta pelos sorovares: Icterohaemorrhagiae, Canicola, Grippotyphosa, Pomona, Copenhageni, Hardjo e Pyrogenes. O motivo da variedade de sorovares nas vacinas é o predomínio dos sorovares em cada região, por outro lado além de não determinar que os animais

não sejam acometidos por outros sorovares não adaptados a espécie, pode predispor ao aparecimento de reações de hipersensibilidade, dessa forma, autores recomendam que as vacinas contra a leptospirose nos cães, sejam compostas por antígenos que promovam proteção para os sorovares prevalentes naquela região (HAGIWARA et al., 2004; DE CASTRO, et al., 2010). . As vacinas presentes no Brasil não contêm o sorogrupo Australis, no qual, o sorovar Bratislava está inserido, portanto, mesmo que os animais examinados fossem vacinados, os mesmos estariam protegidos apenas para o sorovar Icterohaemorrhagiae.

Segundo Hagiwara et al. (2004) títulos de 100 na fase aguda ou com elevação de quatro vezes na fase de convalescençapara para o mesmo sorovar é sugestivo de que a doença seja causada por esse sorovar, condizendo com o resultado da sorologia do presente relato em que os cães examinados foram hospitalizados com suspeita clínica de leptospirose e após realização do MAT, o resultado dos títulos foram altos para os sorovares Bratislava e Icterohaemorrhagiae, confirmando assim a infecção.

Estudos sugerem que o cão pode ser hospedeiro de manutenção para a espécie humana, mediante a realização de estudos que explorou a detecção molecular do sorovar Wolffii em ambos hospedeiros humanos e animais (cães e ovinos) e determinaram que o fragmento amplificado foi 100% semelhante nas espécies estudadas evidenciando que estes animais hospedeiros inclusive a espécie canina podem ter o sorovar Wolffii circulando e sendo transmitido ao ser humano (CASTRO et al, 2011). No presente relato o sorovar Wolffii foi isolado na maioria dos bovinos reagentes, sendo os mesmos possíveis transmissores para os humanos, tornando necessário estudos relacionando os seres humanos e os bovinos.

Portanto não somente para as espécies bovina, ovina e canina, bem como para todas as espécies incluindo os seres humanos, torna-se importante o diagnóstico de leptospiras para o tratamento adequado da infecção, evitando portadores renais, que contribui para o controle da doença além de poder conhecer a epidemiologia da região, implementando medidas de controle também nos reservatórios e ainda o desenvolvimento de vacinas contra leptospirose de acordo com as características epidemiológicas de cada região.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Diagnóstico laboratorial dos animais foi realizado pela Técnica MAT que permitiu avaliar a ocorrência da infecção por leptospira, o método possui baixo custo e é considerado pela OMS como técnica padrão-ouro para o diagnóstico de leptospirose. As amostras de leptospiras isoladas durante o estágio pertencem à espécie *Leptospira interrogans*, sorogrupos Australis, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa, Sejroe, Pomona e sorovarietade Bratislava, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa, Hardjo, Pomona e Wolffi.

O estágio curricular supervisionado obrigatório foi de grande relevância para a formação acadêmica e profissional, possibilitou expandir horizontes e vivenciar uma nova experiência com relação a ética, carga e responsabilidade de trabalho. Houve aprendizado também em relação ao trabalho em equipe e interpessoalidade, ao conviver com muitas pessoas e opiniões que divergiam, sem perder a ética profissional, aspectos que são fundamentais, para o bom funcionamento de uma rotina de trabalho. Sem sombra de dúvidas foi um período que proporcionou uma experiência única de vida.

O interesse pelas zoonoses, fez com que a ênfase deste trabalho fosse a leptospirose considerando que a disseminação da doença se tornou um desafio para todos, principalmente em relação ao controle epidemiológico. Por se tratar de uma zoonose torna-se indispensável o teste de diagnóstico MAT, porém é necessário o desenvolvimento de novas ferramentas para a vigilância epidemiológica, capazes de abranger aspectos ambientais e fatores de riscos, que auxiliem a detecção e acompanhamento de surtos de leptospirose.

7 REFERÊNCIAS

- ADLER, B. Y DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. (2010). *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary microbiology**; 140(3): 287-296.
- ADLER B. **Leptospira and leptospirosis**. Current Topics in Microbiology and Immunology. Berlin: Springer Berlin Heidelberg. 2015; 387. 239p.
- ANZAI, E.K. **Utilização da PCR para o Diagnóstico da Leptospirose em Cães naturalmente infectados por *Leptospira* spp.**, 2006. 48p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.
- ASOH, T. et al. Natural defense by saliva and mucosa against oral infection by *Leptospira*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 60, n. 6, p. 383–389, 2014.
- BRASIL. **Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Leptospirose**. In: Guia de vigilância epidemiológica Brasília: Ministério da Saúde, ed. 7, v. 8, p. 15, 2009.
- BRASIL. **Ministério de Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de vigilância epidemiológica. Guia de vigilância epidemiológica**. 6. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2007.816p.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. Brasília. **Manual de Leptospirose**. Centro Nacional de Epidemiologia. 1995.
- BOLIN, C. A. **Diagnosis and control of bovine leptospirosis**. Proceedings of the 6th Western Dairy Management Conference. Reno, p. 155-160, 2003.
- CASTRO, J. R. et al. Sorovares de *Leptospira* spp. predominantes em exames sorológicos de caninos e humanos no município de Uberlândia, Estado de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Uberlândia-MG, 2010.
- COSTA, F. et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. 2015; 9 (9): 1-19.
- COSTA, D. F. et al. Serological study of the *Leptospira* spp. infection in sheep and goats slaughtered in the State of Paraíba, semiarid of Northeastern Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 2, p. 819- 828, 2016.
- ECKSTEIN, C. al. Diagnosis of *Leptospira* spp. infection in sheepflocks in the State of Mato Grosso, Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.45, p.1- 5, 2017.
- ELLIS, W.A.; Montgomery, J.; Cassells, J.A. (1985). Dihydrostreptomycin treatment of bovine carriers of *Leptospira interrogans* serovar hardjo. **Res. Vet. Sci.**, 39, 292-95.
- EVANGELISTA, K.V.; COBURN, J. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. **Futur. Microbiol.** 2010; 5(9):1413–1425.

EUZÉBY, J.P. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, 47, 590-592. 2019 (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Disponível em: (<http://www.bacterio.net>)).

FAINE, S.;ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. (1999). **Leptospira and Leptospirosis**. Melbourne, Australia, MediSci.

FAVERO, 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, 2001.

FIGUEREDO, C.M. et al. Leptospirose humana no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil: uma abordagem geográfica. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.34, p.331–338, 2001.

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

FOUTS, D.E et al. What Makes a Bacterial Species Patogênica?: Comparative Genomic Analysis of the Genus *Leptospira*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. 2016; 10 (2): 1-57.

FREITAS, J. C. Diagnóstico Laboratorial Da Leptospirose Em Um Cão Utilizando Diferentes Técnicas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 1, p. 111-113, 2005.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (Fiocruz) Bio-manguinhos. 22. Informe de Bio-manguinhos. Disponível em:
www.bio.fiocruz.br/interna/2007_03_diariopopularRS_leptospirose.htm.

GALVÃO S. R. **Aspectos epidemiológicos da infecção por *Leptospira* spp em caninos urbanos de Araguaína, Tocantins, Brasil**. 2009. Dissertação (Doutorado Área de concentração: Sanidade Animal) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária.

GOMES, MARCOS J.P. **Gênero *Leptospira* spp**. Rio Grande do Sul, 2015. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/labacvet>>. Acesso em: 09 junho. 2019.

GREENE, C. E.; SYKES, J. E.; BROWN, C. A. et al. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3.ed. St. Louis: Elsevier, 2006. 1.375 p.

GOARANT C. Leptospirosis: risk factors and management challenges in developing countries. **Research and Reports in Tropical Medicine**. 2016; 7: 49-62.

HAGIWARA, M. K.; LUSTOSA, M.; KOGIKA, M. M. Leptospirose canina. **Vet News**, v. XI, n. 67, p. 7-8, 2004.

HAGIWARA, M. K.; MIOTTO, B.A. & KOGIKA, M.M. 2015. Leptospirose. In: **Tratado de medicina interna de cães e gatos** (eds. by Jericó MM, Neto JPA & Kogika MM), pp. 2678- 708. Roca, Rio de Janeiro, Brasil.

HAIKOLAEI, M. R. H. et al. Comparison of leptospiral infection in the horse and donkey. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 49, n. 2, p. 175-178, 2005.

HARTMANN, K. et al Leptospira Species Infection In Cats Abcd guidelines on prevention and management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.15, p.576-581, 2013.

IVANOVA, S. et al. Leptospira and Rodents in Cambodia: Environmental Determinants of Infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.**, v. 86, n. 6, p. 1032-1038, 2012.

IZURIETA, R.; GALWANKAR, S.; CLEM, A. Leptospirosis: The "mysterious" mimic. **Journal of Emergencies, Trauma and Shock**. 2008; 1 (1): 21-33.

LANGONI, H. et al. Diagnostic methods for the detection of *Leptospira* spp. in biological samples. **Veterinária e Zootecnia**. 2017; 24 (1): 11-20.

LPSN, List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. **Genus *Leptospira***. França, 2019. Disponível em: < <http://www.bacterio.net/leptospira.html> > Acesso em 10 de junho de 2019.

LUCHEIS, S.B.; FERREIRA JUNIOR, R.S. Ovine leptospirosis in Brazil. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.17, n.4, p.394-405, 2011.

MELO, L. S. S. et al. Principais aspectos da infecção por *Leptospira* sp em ovinos. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA. **Ciência Rural**. v.40, n.5, p.1235-1241. Santa Maria. Maio, 2010.

MENDES, A. F. et al. Ocorrência de animais com anticorpos anti-*Leptospira* spp. na região de Uberlândia, MG, 2011-2014. **Revista Agropecuária Técnica**. Areia-PB, v. 39, n. 3, p. 270-276, 2018.

OLIVEIRA, P. P. V. **Fatores de risco para leptospirose como doença ocupacional em surto no interior do Ceará: estudo de caso controle**. 2012. 64 f. Dissertação (Mestre Modalidade Profissional em Epidemiologia em Saúde Pública) - Fundação Oswaldo Cruz, 2012.

PEREIRA, I. A. et al. Leptospirose em fase aguda evoluindo com síndrome de weil e seu frágil diagnóstico sorológico: Relato de um Caso. **Rev Med Minas Gerais**. 2019; 29: e-2020

PICARDEAU, M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. **Médecine et maladies infectieuses**, v.43, n.1, p.1-9, 2013.

PICARDEAU M. The Family Leptospiraceae. In: Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F. editors. **The Prokaryotes Other Major Lineages of Bacteria and The Archaea**. 4 st ed. Berlin: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p.711-729.

PICARDEAU, M. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? **Nature Reviews Microbiology**, v.15, n.5, p. 297-307, 2017.

PIMENTA, C. L. R. M. et al. Seroprevalence and predominant serogroups of *Leptospira* sp. in serological tests of ruminants in northeastern Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 40, n. 4, p. 1513-1522, jul./ago. 2019.

POLACHINI, C.O.; FUJIMORI, K. Canine and human leptospirosis, a possible conjunctival transmission in the Municipality of São Paulo, São Paulo State, Brazil. **Revista Pan- Amazônica de Saúde**. 2015; 6 (3): 59-65.

PUCHE, R. et al. *Leptospira venezuelensis* sp. nov., a new member of the intermediate group isolated from rodents, cattle and humans. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n. December, 2017.

RIBEIRO, M.G. et al. **Leptospirose canina**. Boletim Técnico. Campinas: Departamento Técnico Fort Dodge Saúde Animal; 2003.

ROJAS, P. et al. Detection and quantification of leptospires in urine of dogs: a maintenance host for the zoonotic disease leptospirosis. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.29, n.10, p.1305-1309, 2010

ROSAT, M. C. S. **Incidência de leptospirose após entrega de unidades do programa habitacional Minha Casa Minha Vida na região metropolitana de Porto Alegre/RS**. 2018. Dissertação (Especialização em saúde pública) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul Faculdade de Medicina - Departamento de Medicina social especialização em saúde pública. Porto Alegre, jul.

SANCHÉZ, G. P. Una visión general de la leptospirosis. **Journal of Agriculture and Animal Sciences**. vol. 4, n. 1. Enero - Junio de 2015.

SAMPAIO, P, G. et al. Descrição epidemiológica dos casos de leptospirose em hospital terciário de Rio Branco. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v. 2, n. 1, p 338-342, 2011.

SANTOS, J. P. **Seroprevalência e aspectos epidemiológicos da leptospirose caprina no município de Uberlândia, MG**. 2007. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Curso de Medicina Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Uberlândia.

SARKAR, V. Population-based case-control investigation of risk factors for leptospirosis during in urban epidemic. **American Journal Tropical Medicine Hygiene**, v. 66, n. 5, p. 605- 610, 2002.

SILVEIRA, T. B. **Perfil de crescimento de genomoespécies de *Leptospira* spp. em diferentes meios de cultura**. 2018. Dissertação (Mestrado em Bacteriologia) - Universidade Federal de Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro.

SILVA, F.J. et al. Pesquisa de leptospiros e de anticorpos contra leptospiros em animais e humanos de propriedades rurais nos biomas, D. B.; COSTA, D. F.; SANTOS, C. S. A. B.; HIGINO, S. S. S.; ALVES, C. J.; brasileiros Pantanal e Caatinga. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. 2015; 52 (3): 234-248.

SONJA, O. et al. Seroprevalence of cat leptospirosis in Belgrade (Serbia). **Acta veterinária**, v.64, n.4, p.510- 518, 2014.

SOUZA, V. M. M. et al. Years of potential life lost and hospitalization costs associated with leptospirosis in Brazil. **Revista de Saúde Pública**. 2011; 45 (6): 1001- 1008.

SMYTHE, L. et al. The international committee on systematics of prokaryotes subcommittee on the taxonomy of leptospiraceae. classification of leptospira genomospecies 1, 3, 4 and 5 as *Leptospira alstonii* sp. nov., *Leptospira vanthielii* sp. nov., *Leptospira terpstrae* sp. nov. and *Leptospira yanagawae* sp. nov., respectively. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 2013; 63:1859– 1862.

VASCONCELOS, C. H. et al. Fatores ambientais e socioeconômicos relacionados à distribuição de casos de leptospirose no Estado de Pernambuco, Brasil, 2001–2009. **Caderno de Saúde Coletiva**, v. 20, n. 1, p. 49-56, 2012.

WYNWOOD SJ. et al Leptospirosis from water sources. **Pathogens and Global Health**. 2014; 108 (7): 334-338.

WONG, M.; KATZ, A.R. L.I. D.; WILCOX, B.A. *Leptospira* infection prevalence in small mammal host populations on three Hawaiian Islands. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 2012; 87 (2): 337 - 341.

8 ANEXOS

Anexo1- Ficha de recepção usada pelo Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), MG-2019.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
LABORATÓRIO DE DOENÇAS INFECTOCONTAGIOSAS



TERMO DE AUTORIZAÇÃO

Eu _____, portador do CPF _____,
residente no endereço _____,
bairro _____, CEP _____, telefone _____,
e e-mail _____, autorizo a realização de _____,
exame(s) de _____ do animal de nome _____,
espécie _____, de ficha clínica número _____, solicitado(s) pelo
médico veterinário _____, totalizando um valor de R\$ _____.

Declaro que fui informado da forma de pagamento via cartão no setor financeiro no hospital veterinário da UFU, ou via depósito bancário na conta do Laboratório de Doenças Infectocontagiosas, e que recebi os dados necessários para realizá-lo. Compreendo também que o laudo só será liberado mediante apresentação de comprovante de pagamento.

Forma de pagamento: () Cartão () Depósito () Dinheiro nº da nf ()

Uberlândia, ____ de _____ de 20__

Assinatura do proprietário (a)

Dados bancários para depósito:
Banco do Brasil
Agência:2591-7
Conta corrente: 105191-1
Razão Social: Fundação de Desenvolvimento Agropecuário
CNPJ: 22.225.692/0001-09
Valor: _____

Após efetuar o pagamento, favor enviar o comprovante para o e-mail: ladocvetufu@yahoo.com.br, ou pessoalmente, no dia do retorno.

O LAUDO SÓ SERÁ LIBERADO MEDIANTE A CONFIRMAÇÃO DO DEPÓSITO.

Laboratório de Doenças Infectocontagiosas- FAMEV
Av. Ceará, s/nº - Bloco 2D - Sala 33 - Campus Umuarama - 38400-902 UBERLÂNDIA-MG
Telefone: (0XX34) 3225-8656
ladocvetufu@yahoo.com.br

Fonte: Sistema de registro, 2019

