



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**LAYSA MAYARA SOARES BRITO ROCHA**

**ESTUDO DA LEPTOSPIROSE EM PEQUENOS RUMINANTES  
NO BIOMA CAATINGA**

**PATOS - PB**

**2020**

**LAYSA MAYARA SOARES BRITO ROCHA**

**ESTUDO DA LEPTOSPIROSE EM PEQUENOS RUMINANTES  
NO BIOMA CAATINGA**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Ciência Animal.**

**Orientador: Professor Dr. Clebert José Alves.**

**PATOS - PB**

**2020**



R672e Rocha, Laysa Mayara Soares Brito.  
Estudo da leptospirose em pequeno ruminantes no Bioma  
Caatinga. / Laysa Mayara Soares Brito Rocha. - 2020.

75 f.

Orientador: Prof. Dr. Clebert José Alves.  
Dissertação de Mestrado; (Programa de Pós-graduação  
em Ciência Animal) - Universidade Federal de Campina  
Grande; Centro de Saúde e Tecnologia Rural.

1. Leptospira sp. 2. Isolamento de leptospira sp. 3.  
Trato urinário de ovinos. 4. Trato urinário de caprinos.  
5. Leptospirose em caprinos. 6. Leptospirose em ovinos.  
7. DNA Leptospírico. 8. Sorologia - pequenos ruminantes.  
9. Isolamento bacteriano. 10. Diagnóstico sorológico -  
pequenos ruminantes. I. Alves, Clebert José. II. Título.

CDU: 636.3(043.3)

**Elaboração da Ficha Catalográfica:**

Johnny Rodrigues Barbosa  
Bibliotecário-Documentalista  
CRB-15/626



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL  
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

PROVA DE DEFESA DO TRABALHO DE DISSERTAÇÃO

TÍTULO: “Estudo da leptospirose em pequenos ruminantes no Bioma Caatinga”

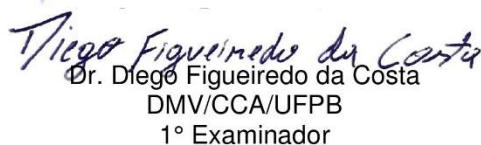
AUTORA: LAYSA MAYARA SOARES BRITO ROCHA

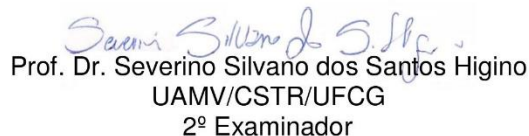
ORIENTADOR: Prof. Dr. CLEBERT JOSÉ ALVES

JULGAMENTO

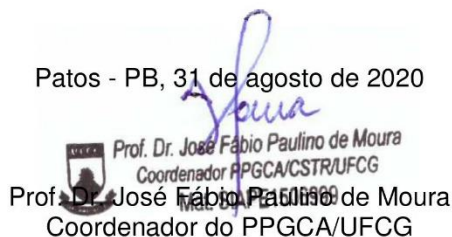
CONCEITO: APROVADO

  
Prof. Dr. Clebert José Alves  
UAMV/CSTR/UFCG  
Presidente

  
Dr. Diego Figueiredo da Costa  
DMV/CCA/UFPB  
1º Examinador

  
Prof. Dr. Severino Silvano dos Santos Higino  
UAMV/CSTR/UFCG  
2º Examinador

Patos - PB, 31 de agosto de 2020

  
Prof. Dr. José Fábio Paulino de Moura  
Coordenador APGCA/CSTR/UFCG  
Prof. Dr. José Fábio Paulino de Moura  
Coordenador do PPGCA/UFCG

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, o autor da vida e maior mestre que alguém pode conhecer.

Aos meus pais, Marcos e Luciana, por toda dedicação, amor e carinho para comigo.

Aos meus irmãos, Leo e Layanna, por sempre acreditarem e me ajudarem a realizar meus sonhos.

Ao meu esposo Claudio (Sales) por sempre me apoiar e se dedicar tanto a nossa família.

A minha filha Laura, que embora muitas noites não tenha me deixado estudar, me motiva a sempre querer evoluir como profissional e ser humano para servir de exemplo pra ela.

Ao meu orientador professor Clebert, serei sempre grata, por toda dedicação e compreensão, por ter sido antes de tudo um ser humano tão bondoso.

Agradeço a todos do Laboratório de Doenças Transmissíveis (LDT), principalmente a Rafael, por toda a ajuda neste trabalho. A dona Francinete por toda ajuda e conhecimento transmitido.

A equipe do Laboratório de Biologia Molecular (LBM), em especial Luana, por toda imensurável ajuda em todas as análises moleculares do projeto e a professora Márcia por ceder o espaço.

Aos meus grandes amigos Juliana, Lidiane, Danilo por todo o incentivo e amizade imensurável.

Aos meus amigos que ganhei durante o período de graduação Denise, Katianny, Nayadjala, Sheyla, Moema, Joyce, Aldenise, Rayra, Michel e Angélica.

Aos meus colegas de pós-graduação

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, em especial Ari, por toda dedicação a sua função, toda contribuição, ajuda e compreensão com todos os alunos do programa. Ao professor e coordenador do programa, José Fábio, por toda ajuda.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e aos professores da UFCG.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho!

**OBRIGADA A TODOS!!**

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

**Figure 1.** A árvore filogenética construída pelo método Neighbor-Joining e modelo Jukes-Cantor, bootstrap com 1000 repetições. ▲ Amostras sequenciadas.....41

### CAPÍTULO II

**Figure 1.** A árvore filogenética construída pelo método Neighbor-Joining e modelo Jukes-Cantor, bootstrap com 1000 repetições. ▲ Amostras sequenciadas.....65

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

**Tabela 1.** Resultados obtidos de *Leptospira* sp. utilizando diferentes técnicas diagnosticas (MAT, PCR e Cultura de *Leptospira* sp.) em cabras criadas em condições de ambiente semiárido.....42

**Tabela 2.** Resultados da PCR de tecidos do trato urinario e Crescimento de *Leptospira* sp. em cabras criadas em condições de ambiente semiárido.....43

**Tabela 3.** Porcentagem de animais positivos de acordo com o método diagnóstico utilizado em cabras criadas em condições de ambiente semiárido.....44

### CAPÍTULO II

**Tabela 1.** Resultados obtidos de *Leptospira* sp. utilizando diferentes técnicas diagnosticas (MAT, PCR e Cultura de *Leptospira* sp.) em ovinos criados em condições de ambiente semiárido.....66

## SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
INTRODUÇÃO GERAL.....	11
REFERÊNCIAS.....	13
CAPÍTULO I.....	19
Achados sorológico, molecular e isolamento de <i>Leptospira</i> sp do trato urinário de cabras portadoras mantidas em condições de ambiente semiárido.....	20
RESUMO.....	21
ABSTRACT.....	21
INTRODUÇÃO.....	22
MATERIAL E MÉTODOS.....	24
Área de estudo e coleta de materiais biológicos .....	24
Diagnóstico sorológico .....	25
Isolamento bacteriano .....	25
Detecção molecular de <i>Leptospira</i> sp.....	26
Análise estatística.....	27
RESULTADOS.....	27
DISCUSSÃO.....	28
CONCLUSÃO.....	32
REFERÊNCIAS.....	33
CAPÍTULO II.....	45
Achados sorológico, molecular e isolamento de <i>Leptospira</i> sp. do trato urinário de ovinos portadores mantidos em condições de ambiente semiárido.....	46
RESUMO.....	47
ABSTRACT.....	48
INTRODUÇÃO.....	48
MATERIAL E MÉTODOS.....	51
Área de estudo e coleta de materiais biológicos .....	52
Diagnóstico sorológico .....	52
Isolamento bacteriano .....	53
Detecção molecular de <i>Leptospira</i> sp.....	53
Análise estatística.....	54



RESULTADOS.....	54
DISCUSSÃO.....	55
CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIAS.....	58
CONCLUSÃO GERAL.....	75

## RESUMO

A leptospirose é uma enfermidade de caráter zoonótico, que apresenta ampla distribuição mundial, sendo apontada como uma das enfermidades mais frequentes que provocam distúrbios reprodutivos nos pequenos ruminantes. O objetivo do trabalho foi determinar a frequência de caprinos fêmeas e ovinos machos soropositivos para pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira* spp., bem como identificar os sorogrupos predominantes no Semiárido paraibano, detectar DNA de *Leptospira* spp. e isolamento bacteriológico de *Leptospira* sp., no trato urinário de caprinos fêmeas e ovinos machos abatidos no matadouro público de Patos, PB. Descreve-se 34 fêmeas adultas da espécie caprina no capítulo I e 24 machos adultos da espécie ovina no capítulo II. Coletou-se amostras de tecido renal e bexiga na linha de abate para posterior detecção molecular por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) e isolamento bacteriológico. As amostras com melhores reações foram amplificadas e submetidas ao sequenciamento genético. O sangue coletado foi destinado à investigação sorológica por meio do teste de aglutinação microscópica (SAM), utilizando-se 24 sorovares como antígenos e ponto de corte 1:100. No capítulo I a frequência de sororeativos encontrada foi de 17,6 %, com títulos variando entre 100 a 200. Os sorovares Autumnalis, Icterohaemorrhagiae, Tarassovi foram os mais frequentes nesse estudo com 33,3% cada. Na PCR foi encontrado DNA leptospírico em 17,6% das amostras de tecido renal e 5,8% de bexiga. Foi possível realizar o sequenciamento em uma amostra de tecido renal com 99% de similaridade à *L. interrogans* e isolamento em duas amostras de tecido renal (5,8%) e uma de bexiga (2,9%). No Capítulo II não foi encontrado animal sororeativo. Na PCR foi encontrado DNA leptospírico em 16,0% das amostras de tecido renal e 41,6% de bexiga. Foi possível realizar o sequenciamento em três amostras de tecido renal com 99% de similaridade à *L. interrogans* e isolamento em duas amostras de tecido renal (8,3%) e duas de bexiga (8,3%). Conclui-se que o trato urinário é um importante local de colonização de leptospiros em pequenos ruminantes criados no semiárido nordestino. Os resultados moleculares demonstram a grande quantidade de animais assintomáticos portadores de leptospiros, enfatizando a necessidade de associar a MAT e PCR para um seguro diagnóstico da leptospirose em caprinos e ovinos.

**Palavras-chave:** Leptospirose; clima semiárido; sorologia; PCR; DNA leptospírico.

## ABSTRACT

Leptospirosis is a disease of a zoonotic character, which has a wide worldwide distribution, was identified as one of the most frequent illnesses that cause reproductive disorders in small ruminants. The objective of the work was to determine the frequency of seropositive female goats and male sheep to search for anti-*Leptospira* spp. Antibodies, as well as to identify the predominant serogroups in the Semi-arid of Paraíba, to detect *Leptospira* spp DNA. and bacteriological isolation of *Leptospira* sp., in the urinary tract of female goats and male sheep slaughtered in the public slaughterhouse in Patos, PB. 34 adult females of the caprine species were described in Chapter I and 24 adult males of the sheep species in chapter II. Samples of kidney and bladder tissue were collected in the slaughter line for later molecular detection through polymerase chain reaction (PCR) and bacteriological isolation. The samples with the best response were amplified and subjected to genetic sequencing. The blood collected was used for serological investigation using the microscopic agglutination test (SAM), using 24 serovars as antigens and a cut-off point of 1: 100. In Chapter I, the frequency of seroreactivity found was 17.6%, with titers ranging from 100 to 200. The serovars Autumnalis, Icterohaemorrhagiae, Tarassovi were the most frequent in this study by 33.3% each. In PCR, leptospiral DNA was found in 17.6% of renal tissue samples and 5.8% of the bladder. It was possible to perform the sequencing in a sample of renal tissue with 99% similarity to *L. interrogans* and isolation in two samples of renal tissue (5.8%) and one of the bladders (2.9%). In Chapter II, no seroreactive animal was found. In PCR, leptospiral DNA was found in 16.0% of the renal tissue samples and 41.6% of the bladder. It was possible to perform the sequencing in three selected renal tissue with 99% similarity to *L. interrogans* and isolation in two samples of renal tissue (8.3%) and two of the bladder (8.3%). We conclude that the urinary tract is a necessary site for the colonization of leptospires in small ruminants raised in the Northeast semiarid. The molecular results show a large number of asymptomatic animals with leptospires, require to associate MAT and PCR for a safe diagnosis of leptospirosis in goats and sheep.

**Keywords:** Leptospirosis; semiarid climate; serology; PCR; Leptospiric DNA.

## INTRODUÇÃO GERAL

A leptospirose é uma doença bacteriana zoonótica difundida mundialmente (ADLER, 2015; ELLIS, 2015). No Brasil é uma das enfermidades que mais causam prejuízos econômicos nas criações de pequenos ruminantes. O seu principal impacto é o comprometimento do desempenho reprodutivo dos rebanhos acometidos (SUEPAUL et al., 2011; ELLIS 2015).

Essas espiroquetas são da ordem Spirochaetales, família Leptospiraceae, gênero *Leptospira* sp. (ADLER & MOCTEZUMA, 2010). Sua estrutura possui cilindro protoplasmático helicoidal, com diâmetro delgado (0,1µm) e comprimento de 6 a 20 µm, móvel, aeróbios estritos e apresentam uma ou ambas as extremidades encurvadas ou em forma de gancho (QUINN et al., 2005; LEVETT et al., 2010). Movimentam-se através de rotações e flexões ao longo de seu próprio eixo. Para crescimento e multiplicação é necessário temperaturas que variam de 28 a 30°C e pH 7,2 a 7,6 (FAINE et al., 1999). Sensíveis a dessecação, desinfetantes, incidência de luz solar direta, pH ácido menor que 6,8 ou básico maior que 8,0 e temperaturas inferiores a 10° C ou superiores a 50° C. Conseguem sobreviver bem na água e em cultura por longos períodos (TRUEBA et al., 2004).

As leptospirosas estão classificadas em 19 genótipos, sendo 14 espécies patogênicas: *L. alexanderi*, *L. alstonii*, *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans* (senso estrito), *L. fainei*, *L. kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. terpstrae*, *L. weilii*, *L. wolffi* e *L. mayottensis*, com mais de 260 sorovares. As espécies saprófitas incluem *L. biflexa* (senso estrito), *L. meyeri*, *L. yanagawae*, *L. kmetyi*, *L. vanthielii* e *L. wolbachii*, com mais de 60 sorovares (ADLER & MOCTEZUMA, 2010; BRASIL, 2010).

As leptospirosas penetram de forma ativa no organismo através das mucosas e pele lesada ou íntegra, devido sua motilidade e morfologia, invadindo a circulação (ADLER, 2015; ELLIS, 2015). Nos rins elas encontram ambiente que confere proteção contra sistema imune do hospedeiro (MCBRIDE et al., 2005), são excretadas pela urina, contaminando todo o ambiente (LOUREIRO & LILENBAUM, 2020), podem ser eliminadas pelo fluido vaginal (LILENBAUM et al., 2008). Dessa forma a transmissão pode se dar por contato direto com a urina de animal portador, ou água, solo e fômites contaminados (PICARDEAU, 2013).

A enfermidade pode causar um quadro agudo, subagudo ou permanecer clinicamente inaparente, vai depender principalmente da adaptação do hospedeiro ao sorovar infectante (ACHA & SZYFRES, 2001). Os animais que desenvolvem a doença clinicamente e vão à óbito ou cura são classificados de hospedeiros susceptíveis, e os hospedeiros de manutenção são aqueles que não desenvolvem sinais clínicos, mas persistem com as leptospiros no organismo (FAINE et al., 1999; PAULA et al., 2014).

Entre as técnicas de diagnóstico baseadas na detecção de anticorpos temos a soroprecipitação microscópica (SAM) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA) (FAINE et al., 1999; OIE, 2008; ADLER & MOCTEZUMA, 2010). Por métodos diretos temos exame direto em microscopia de campo escuro, reação em cadeia da polimerase (PCR), imunofluorescência, histopatologia e isolamento a partir de cultura bacteriana e/ou inoculação em animais (LEVETT, 2001).

A leptospirose possui caráter sazonal, com maior frequência em países de clima tropical e subtropical, além de apresentar aumento nos períodos de alto índice pluviométrico (MARTINS & PENNA & LILENBAUN, 2010). Praticamente todos os países onde foram realizadas investigações epidemiológicas, as leptospiros foram identificadas (OLIVEIRA et al., 2013).

A prevalência de *Leptospira* spp. em caprinos e ovinos no Brasil tem uma enorme variação segundo alguns estudos. Em caprinos foi observado uma prevalência de 31,1% em Minas Gerais (SANTOS et al., 2012;), 35,5% em Santa Catarina (TOPAZIO et al., 2015), 29,0-32,67% em Sergipe (RIZZO et al., 2015; SILVA, 2015), 14,5% no Rio Grande do Norte (ARAÚJO NETO et al., 2010), 5,2-34,65% na Paraíba (HIGINO et al., 2012; SILVA, 2015; COSTA et al., 2016), 20,9 no Rio de Janeiro (LILENBAUM et al., 2008), 28,52% no Ceará (SILVA, 2015), 41,90% na Bahia (SILVA, 2015) e 34,6% no Piauí (CAMPOS et al., 2017).

Em ovinos há também uma grande variação de prevalência entre as regiões. No Rio Grande do Sul foi descrito uma prevalência de 34,26% (HERMANN, 2004), 0,7-28,6% em São Paulo (FAVERO et al., 2002; SILVA, 2012; RIZZO et al., 2014), 13,70-47,4% no Rio de Janeiro (LILENBAUM et al., 2008; MARTINS et al., 2012), 22,2% em Minas Gerais (SALABERRY et al., 2011), 3% no Distrito Federal (SEIXAS et al., 2011), 33,3% em Rondônia (AGUIAR et al., 2010), 10,4% no Espírito Santo (CORTIZO et al., 2014), 32% no Maranhão (CARVALHO et al., 2012), 28,6-40,5% no Piauí (CAMPOS et al., 2017) e 7,5-11,2% na Paraíba (HIGINO et al., 2010; COSTA et al., 2016).

Em regiões de clima semiárido como na região semi-árida do nordeste brasileiro a ocorrência da doença está ligada a altas concentrações de animais em locais próximos a águas represadas, animais assintomáticos e transmissão venérea (OLIVEIRA et al., 2013; SILVA et al., 2018). No estudo feito por NOGUEIRA et al. (2020) foi visto um aumento de animais positivos no período seco comparado ao período de maior índice pluviométrico, demonstrando a transmissão venérea como uma das rotas alternativas das leptospirosas para disseminação e adaptabilidade nessa região de clima seco.

Os estudos no semiárido paraibano tem demonstrado que a prevalência da leptospirose nos rebanhos caprinos e ovinos independem do clima, enfatizando a resiliência dos animais nativos, a transmissão por contato íntimo e venérea. Torna-se imprescindível sabermos quais os principais sorovares que acometem esses animais para montar um banco de dados e avançar no controle e prevenção da doença.

A presente dissertação é composta por dois capítulos. O Capítulo I é um artigo que será submetido a revista *Ciência Rural*, tendo por objetivo demonstrar a epidemiologia e diagnóstico da leptospirose em região semiárida através da detecção sorológica, molecular e microbiológica de *Leptospira* sp. a partir do trato urinário de 34 fêmeas adultas da espécie caprina, abatidas no semiárido do estado da Paraíba, Nordeste do Brasil. O Capítulo II é um artigo que será submetido a revista *Ciência Rural*, tendo por objetivo demonstrar a epidemiologia e diagnóstico da leptospirose em região semiárida através da detecção sorológica, molecular e microbiológica de *Leptospira* sp. a partir do trato urinário de 24 machos adultos da espécie ovina, abatidos no semiárido do estado da Paraíba, Nordeste do Brasil.

## REFERÊNCIAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3. ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud/Oficina Sanitária Panamericana/Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud, v. 1, n.1, p. 398, 2001.

ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3-4, p. 287-296, 2010. Available from: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113509001163> >. Accessed: Abr. 18, 2018. doi:10.1016/j.vetmic.2009.03.012.

ADLER, B. History of leptospirosis and leptospira. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, Amsterdã, v. 387, p. 79-84, 2015. Available from: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-662-45059-8> >. Accessed: Fev. 29, 2020. doi: 10.1007 / 978-3-662-45059-8-1.

AGUIAR, D. M. et al. Anticorpos anti-*Leptospira* spp. em ovinos do Município de Monte Negro, Estado de Rondônia. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, SP, v. 77, n. 3, p. 529-532, 2010. Available from: < [http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v77\\_3/aguiar.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v77_3/aguiar.pdf) >. Accessed: Abr. 24, 2018.

ARAÚJO NETO, J. O. et al. Soroprevalência da leptospirose em caprinos da microrregião do Seridó Oriental, Estado do Rio Grande do Norte, Brasil, e pesquisa de fatores de risco. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.47, n.2, 2010. Available from: < <http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/26839> >. Accessed: Jun. 20, 2018. doi: 10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2010.26839.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica**. – 8. ed. rev. – Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

CAMPOS, A. P. et al. Seroprevalence and risk factors for leptospirosis in cattle, sheep, and goats at consorted rearing from the State of Piauí, northeastern Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 49, n. 5, p. 899-907, 2017. Available from: < <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/34034> >. Accessed: Jan. 10, 2019. doi: 10.5433/1679-0359.2019v40n4p1513.

CARVALHO, S. M. **Avaliação das alterações em rim, fígado e pulmões de ovinos infectados por leptospiras**. 74f. Tese (Doutorado) Programa de pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2012.

CORTIZO, P. et al. Risk factors to incidental leptospirosis and its role on the reproduction of ewes and goats of Espírito Santo state, Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v.47, n.1, p.231-235, 2014. Available from: < [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782017000700452&lng=en&tlng=en](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782017000700452&lng=en&tlng=en) >. Accessed: Set. 18, 2018. doi: 10.1590/0103-8478cr20160845

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**, v. 37, n. 2, 2016. Available from: < <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/20974> > Accessed: Ago. 14, 2018. doi: 10.5433/1679-0359.2016v37n2p819

ELLIS, W. A. **Animal leptospirosis**. Current Topics in Microbiology and Immunology, Tokyo, v. 387, n. 1, p. 99-137, 2015. Available from: < [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-45059-8\\_6](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-45059-8_6) > Accessed: Jul. 23, 2018. doi: 10.1007/978-3-662-45059-8\_6

FAINE, S. et al. **Leptospira and Leptospirosis**. 2ed. Melbourne: MediSci Press, 1999. 272p.

FAVERO, A. C. M. et al. Sorovares de leptospirosas predominantes em exames sorologicos de bubalinos, ovinos, caprinos, equinos, suinos e caes de diversos estados brasileiros. **Cienc. Rural**, v. 32, p. 613-619, 2002. Available from: < [https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010384782002000400011&script=sci\\_abstract&tlng=pt](https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010384782002000400011&script=sci_abstract&tlng=pt) > Accessed: Jul. 3, 2018. doi: 10.1590/S0103-84782002000400011.

HERRMANN, G. P. et al. Soroprevalência de aglutininas anti-*Leptospira* spp. em ovinos nas Mesorregiões Sudeste e Sudoeste do Estado Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 34, n. 2, p. 443-448, 2004. Available from: < [https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010384782004000200017&script=sci\\_arttext&tlng=pt](https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010384782004000200017&script=sci_arttext&tlng=pt) > Accessed: Fev. 5, 2020. doi: 10.1590/S0103-84782004000200017.

HIGINO, S. S. S.; et al. Frequência de leptospirose em ovinos abatidos no Município de Patos, Paraíba. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, SP, v. 77, n. 3, p. 525-527, 2010. Available from: < [http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/arq/v77\\_3/higino.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/arq/v77_3/higino.pdf) > Accessed: Jul. 6, 2020.

HIGINO, S. S. S. et al. Prevalência de leptospirose em caprinos leiteiros do semiárido paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.3, p.199-203, 2012. Available from: < [https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100736X2012000300003&script=sci\\_abstract&tlng=pt](https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100736X2012000300003&script=sci_abstract&tlng=pt) > Accessed: Ago. 19, 2018. doi: 10.1590/S0100-736X2012000300003.

LEVETT, P. N.; HAAKE, D. A. **Leptospira species (leptospirosis)**. Principles and practice of infectious diseases. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier, 2010.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p.296-326, 2001. Available from: < <https://cmr.asm.org/content/14/2/296> > Accessed: Dez. 2, 2019. doi: 10.1128/CMR.14.2.296-326.2001.

LILENBAUM W., et al. Risk factors associated with leptospirosis in dairy goats under tropical conditions in Brazil. **Res. Vet. Sci.** v. 84, n. 1, p. 14-21. 2008. Available from:



< <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0034528807000872> >

Accessed: Nov. 22, 2019. doi: 10.1016/j.rvsc.2007.03.011

LOUREIRO, A. P., LILENBAUM, W. Genital bovine leptospirosis: a new look for an old disease. **Theriogenology**. v. 141, p. 41–47, 2020. Available from: <

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X19303930> >

Accessed: Jul. 30, 2020. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.09.011.

MARTINS G. et al. Leptospirosis as the most frequent infectious disease impairing productivity in small ruminants in Rio de Janeiro, Brazil. **Trop. Anim. Health Prod.** v. 44, n. 4, p. 773-777, 2012. Available from: <

<https://link.springer.com/article/10.1007/s11250-011-9964-4> > Accessed: Fev. 10,

2020. doi: 10.1007/s11250-011-9964-4.

MARTINS G. et al. Maintenance of *Leptospira* infection in cattle under tropical conditions. **Vet. Rec.** v. 167, p. 629–630, 2010. Available from: <

<https://veterinaryrecord.bmj.com/content/167/16/629> > Accessed: Fev. 20, 2020. doi:

10.1136/vr.c5695.

McBRIDE, A. J.; ATHANAZIO, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. Leptospirosis. **Current Opinion Infectious Diseases**, v.18, n.1, p. 376 386, 2005. Available from: <

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16148523/> > Accessed: Ago. 31, 2019. doi: :

10.1097/01.qco.0000178824.05715.2c.

NOGUEIRA, D. B. et al. Use of serological and molecular techniques for detection of *Leptospira* sp. carrier sheep under semiarid conditions and the importance of genital transmission route. **Acta tropica**. 2020. Available from: <

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X20303818> > Accessed:

Ago . 01, 2020. doi: 10.1016/j.actatropica.2020.105497.

OIE, WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. **OIE Listed Diseases and Other Diseases of Importance to International Trade**. *In*: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2008.

OLIVEIRA, S. V.; ARSKY, M. L. N. S.; CALDAS, E. P. Reservatórios animais da leptospirose: Uma revisão bibliográfica. Santa Maria: **UFSM**, v. 39, n. 1, p. 9-20, 2013.

Available from: < <https://periodicos.ufsm.br/revistasaudef/article/view/5094/0> >

Accessed: Jul . 22, 2020. doi: 10.5902/223658345094.

PAULA, E. M. N. et al. Principais causas bacterianas de abortamento em bovinos.

**PUBVET**, Londrina, v. 8, n. 7, Ed. 256, Art. 1699, abril, 2014. Available from: <

<http://www.pubvet.com.br/artigo/1154/principais-causas-bacterianas-de-abortamento-em-bovinos> > Accessed: Jun . 02, 2019.

PICARDEAU, M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. **Médecine et Maladies Infectieuses**, Paris, n. 43, n. 1, p. 1-9, 2013. Available from: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0399077X12003198?via%3Dihub> > Accessed: Mai . 23, 2019. doi: 10.1016/j.medmal.2012.

QUINN, P. J. et al. Espiroquetas. In: QUINN, P. J. et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. Cap. 31. p. 179-188.

RIZZO, H. et al. Ocorrência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em caprinos do estado de Sergipe, Brasil, **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 18, p. 248-252, 2015. Available from: < [http://www.rcvt.org.br/volume18\\_2/volume18\\_numero\\_2.pdf](http://www.rcvt.org.br/volume18_2/volume18_numero_2.pdf). > Accessed: Dez . 14, 2019.

RIZZO, H. et al. Soropositividade para leptospirose e desempenho reprodutivo de ovinos de criatórios localizados no estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, RJ, v. 36, n. 3, p. 244-250, 2014. Available from: < <http://www.rbmv.com.br/index.php?link=verart&tipo=ID&campo1=877> > Accessed: Jan . 13, 2020.

SALABERRY, R. S. S; et al. Seroprevalence and risk factors of antibodies against leptospira spp. in ovinos from Uberlândia municipality, Minas Gerais state, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, SP, v. 42, p. 1427-1433, 2011. Available from: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3768720/> > Accessed: Out. 25, 2019. doi: 10.1590/S1517-838220110004000026.

SANTOS, P. J. et al. Seroprevalence and risk factors for leptospirosis in goats in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil, **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, p. 101-106, 2012. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11250-011-9894-1> > Accessed: Mai. 30, 2019. doi: 10.1007/s11250-011-9894-1.

SEIXAS, L. S., MELO, C. B., LEITE, R. C., MOREIRA, E. C., MC MANUS, C. M.; CASTRO, M. B. Anti-*Leptospira* sp. agglutinins in ewes in the Federal District, Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 43, p. 9-11, 2011. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11250-010-9677-0> > Accessed: Abr. 09, 2020. doi: 10.1007/s11250-010-9677-0.

SILVA A. F. et al. High frequency of genital carriers of *Leptospira* sp. in sheep slaughtered in the semi-arid region of northeastern Brazil. **Trop Anim Health Prod**. v.

51, n. 43, 2018. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11250-018-1657-9> > Accessed: Ago. 09, 2019. doi: 10.1007/s11250-018-1657-9.

SILVA, G. C. P. **Caracterização epidemiológica de brucelose e leptospirose de pequenos ruminantes dos estados de Sergipe, Bahia, Ceará e Paraíba.** 2015. 112. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Câmpus Jaboticabal, São Paulo. 2015.

SILVA, R. C. et al. Frequency of *Leptospira* spp. in sheep from Brazilian 6 slaughterhouses and its association with epidemiological variables. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.32, n.3, p.194-198, 2012. Available from: < [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-736X2012000300002](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2012000300002) > Accessed: Ago. 29, 2019. doi: 10.1590/S0100-736X2012000300002.

SUEPAUL, S.M. et al. Seroepidemiology of leptospirosis in livestock in Trinidad. **Trop. Anim. Health Prod.** v. 43, p. 367–375, 2011. Available from: < <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11250-010-9698-8> > Accessed: Out. 13, 2019. doi: 10.1007/s11250-010-9698-8.

TOPAZIO, J. et al. Antibodies to *Leptospira interrogans* in goats and risk factors of the disease in Santa Catarina (West side), Brazil. **Research in Veterinary Science**, v.99, p.53-57, 2015. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034528815000399> >. Accessed: Fev. 09, 2020. doi: 10.1016/j.rvsc.2015.01.014.

TRUEBA, G. et al. Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. Rockville Pike: **International Microbiology**. n. 7, p. 35- 40, 2004. Available from< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15179605/> >. Accessed: Abr. 30, 2020.

## **CAPÍTULO I:**

### **Achados sorológicos, moleculares e microbiológicos de *Leptospira* sp. do trato urinário de cabras portadoras em condições de clima semiárido**

Laysa Mayara Soares Brito Rocha; Pedro Jorge Álvares de Faria; Aline Ferreira da Silva; Rafael Rodrigues Soares; João Pessoa Araújo Júnior; Camila Dantas Malossi; Leila Sabrina Ullmann; Diego Figueiredo da Costa; Maria Luana Cristiny Rodrigues Silva; Severino Silvano dos Santos Higino; Sergio Santos de Azevedo; Clebert José

Alves

Trabalho a ser submetido à revista *Ciência Rural*

(Qualis A2)

**Achados sorológicos, moleculares e microbiológicos de *Leptospira* sp. do trato urinário de cabras portadoras em condições de clima semiárido**

**Serological, molecular and microbiological findings of *Leptospira* sp. of the urinary tract of carrier goats in semi-arid climate conditions**

Laysa Mayara Soares Brito Rocha<sup>1</sup>; Pedro Jorge Álvares de Faria<sup>1</sup>; Aline Ferreira da Silva; Rafael Rodrigues Soares<sup>1</sup>; João Pessoa Araújo Júnior<sup>2</sup>; Camila Dantas Malossi<sup>2</sup>; Leila Sabrina Ullmann<sup>2</sup>; Diego Figueiredo da Costa<sup>3</sup>; Maria Luana Cristiny Rodrigues Silva<sup>1</sup>; Severino Silvano dos Santos Higino<sup>1</sup>; Sergio Santos de Azevedo<sup>1</sup>; Clebert José Alves<sup>1\*</sup>

\*\*E-mail for correspondence: clebertja@uol.com.br

<sup>1</sup>Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Av. Universitária, no number, Santa Cecília, Patos, Paraíba 58707-110, Brazil.

<sup>2</sup>Universidade Estadual Paulista (Unesp), Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro, s/n, Campus de Botucatu, Botucatu, SP 18618-687, Brazil.

<sup>3</sup>Department of Veterinary Sciences, UFPB, Federal University of Paraíba, Paraíba, Brazil,

<https://orcid.org/0000-0002-2698-2060>

**RESUMO:** *A leptospirose é uma importante enfermidade infecciosa na caprinocultura, afetando negativamente a produtividade. Este trabalho teve como objetivo avaliar os achados sorológicos, moleculares e isolamento de leptospiras patogênicas no trato urinário (tecido renal e bexiga) de cabras. Foram utilizadas trinta e quatro cabras adultas destinadas ao abate. Amostras renais (n = 34), bexiga (n = 34), foram coletadas para isolamento do agente e detecção molecular de DNA de Leptospira sp. e amostras de sangue (n = 34) para teste sorológico. A Reação em cadeia da polimerase (PCR) foi usada como teste molecular e o teste de soroaglutinação microscópica (SAM) foi usado como teste sorológico. As amostras com amplificação de DNA foram submetidas ao sequenciamento genético. A presença de DNA de leptospira foi encontrada nos tecidos de 8 (23,4%) cabras, e desses, apenas dois foram positivos na PCR e MAT. Houve ligeira concordância entre as técnicas de PCR e MAT ( $k = 0,150$ ;  $p = 0,436$ ). Em 6 (17,6%) amostras do tecido renal e em duas (5,8%) amostras de bexiga, foi detectado o DNA da leptospira. Os genes de uma amostra de tecido renal foi sequenciada e demonstrou 99% de similaridade com Leptospira interrogans. Anticorpos anti-Leptospira sp. foram detectados em 6 (17,6%) dos animais testados. Os resultados reforçam a importância do trato urinário, especialmente a bexiga como sítio de colonização das leptospiras além do tecido renal.*

**Palavras-chave:** Cabras, Leptospirose, isolamento, Trato urinário, Detecção molecular, epidemiologia, semiárido.

**ABSTRACT:** *Leptospirosis is an important infectious disease in goat farming, negatively affecting productivity. This work aimed to evaluate the serological and molecular findings and isolation of pathogenic leptospire in the urinary tract (kidney and bladder tissue) of goats. Thirty-four adult goats were used for slaughter. Renal*

*samples (n = 34), bladder (n = 34), were collected for isolation of the agent and molecular detection of Leptospira sp. and blood samples (n = 34) for serological testing. The polymerase chain reaction (PCR) was used as a molecular test and the microscopic serum agglutination test (SAM) was used as a serological test. Samples with DNA amplification were subjected to genetic sequencing. The presence of leptospira DNA was found in the tissues of 8 (23.4%) goats, and of these, only two were positive in PCR and MAT. There was a slight agreement between the PCR and MAT techniques ( $k = 0.150$ ;  $p = 0.436$ ). In 6 (17.6%) samples of renal tissue and two (5.8%) bladder samples, leptospira DNA was detected. The genes in a kidney tissue sample were sequenced and demonstrated 99% similarity to Leptospira interrogans. Anti-Leptospira sp. were detected in 6 (17.6%) of the animals tested. The results reinforce the importance of the urinary tract, especially the bladder as a site of colonization of leptospires in addition to renal tissue.*

**Keywords:** *Goats, Leptospirosis, isolation, Urinary tract, Molecular detection, epidemiology, semiarid.*

## **INTRODUÇÃO**

A caprinocultura é uma atividade de grande importância, principalmente na região Nordeste (RIET-CORREA et al., 2013). Como em outros países subdesenvolvidos a criação dessas espécies está diretamente ligada à segurança econômica e social de pequenos agricultores em sua grande maioria (PUGH & BAIRD, 2012).

O efetivo de caprinos no Brasil é de 8.260.607, sendo cerca de 93,9% (10.047.755) na região Nordeste (IBGE, 2019). Embora tenha havido uma evolução mercadológica, ainda há muito para melhorar e a falta de investimento em tecnificação no rebanho, principalmente no manejo, fazem com que as enfermidades infecciosas, como a

leptospirose, ganhem destaque com relação à queda de produtividade (MARTINS et al. 2012).

A leptospirose é uma zoonose, mundialmente distribuída e que acarreta elevados prejuízos econômicos para a pecuária nacional. O seu principal impacto é o comprometimento do desempenho reprodutivo como abortamentos, natimortos, infertilidade e retenção placentária, diminuindo a produtividade dos rebanhos acometidos (ADLER 2015; ELLIS 2015).

A sua disseminação é crescente e geralmente ligada a presença de roedores, falta de assistência veterinária, erros de manejo, criações consorciadas, a rusticidade dos animais nativos, transmissão venerea e alta pluviosidade (ALVES et al., 1996; VANASCO et al., 2008; LILENBAUM et al., 2008; SANTOS et al., 2012; HIGINO et al., 2012; COSTA et al., 2016; SILVA et al., 2018). Embora bem estabelecido a relação entre pluviosidade e frequência de animais sororreativos (ALVES et al., 1996; VANASCO et al., 2008), a pesquisa realizada por NOGUEIRA et al., (2020) em ovinos, não mostrou diferença estatística da prevalência da doença nos rebanhos entre período chuvoso e período de seca, enfatizando a importância de animais portadores assintomáticos no rebanho como forma de manutenção da doença (COSTA et al., 2016).

A prevalência da leptospira em rebanhos caprinos no Brasil varia entre 3,4 a 31,3% (HIGINO & AZEVEDO, 2014). A prevalência entre os estados brasileiros tem demonstrado grande variação. Em Santa Catarina foi encontrado uma prevalência de 35,3% (TOPAZIO et al., 2015), Minas Gerais 31,1% (SANTOS et al., 2012;), Rio de Janeiro 20,9% (LILENBAUM et al., 2008), na Bahia 41,90% (SILVA, 2015), em Sergipe 29,0%- 32,67% (RIZZO et al., 2015), na Paraíba 5,2-34,65% (HIGINO et al., 2012; SILVA, 2015; COSTA et al., 2016), no Rio Grande do Norte 14,5% (ARAÚJO NETO et al., 2010), no Ceará 28,52% (SILVA, 2015), e no Piauí 34,6% (CAMPOS et al, 2017).



O método de diagnóstico mais utilizado é o teste de aglutinação microscópica (MAT), que utiliza culturas vivas de *Leptospira* sp. como antígenos (MARTINS & LILENBAUM, 2014). Embora amplamente utilizado e com alta especificidade, ele é um teste deficiente quando usado sozinho visto que a ausência de níveis detectáveis de anticorpos séricos em algumas espécies animais torna-o menos sensível (ELLIS, 2015).

Desta forma, o isolamento e detecção molecular de leptospiros é de grande importância do ponto de vista epidemiológico, pois permite a identificação dos sorovares circulantes em determinada região, além de identificar animais portadores que apresentam resultados negativos em outros testes, como a SAM, o que tem implicação direta nas ações de controle da infecção (COSTA et al., 2016; SILVA et al., 2018).

Tendo em vista a relevância dessa enfermidade nos rebanhos de pequenos ruminantes, responsável por perdas econômicas expressivas, muitas vezes despercebidas pelos produtores, devido suas características produtivas e reprodutivas, agravado pelo fato dessa enfermidade também ser uma importante zoonose de bastante interesse para saúde pública (ELLIS, 2015) e também associado ao pequeno número de estudos quanto aos aspectos determinantes da doença em caprinos criados no bioma caatinga (MARTINS & LILENBAUM, 2014; COSTA et al., 2016) foi estruturado o trabalho de pesquisa com o objetivo de avaliar os achados sorológicos, moleculares e isolamento bacteriológico de leptospiros patogênicos a partir do trato urinário de cabras.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### *Área de estudo e coleta de materiais biológicos*

O estudo foi realizado no matadouro municipal de Patos, mesorregião do Sertão do estado da Paraíba, localizada na região semiárida do Nordeste do Brasil (latitude: 07 °

01 ' 28 " S; longitude: 37 ° 16 ' 48 " W), pertencente ao bioma caatinga, estando 245m acima do nível do mar, apresentando temperatura média anual de 25,5°C e 728mm de pluviosidade. A cidade de Patos tem 472,892 Km<sup>2</sup> de área territorial e efetivo de 3.098 cabeças de caprinos. Foram utilizadas 34 caprinos adultas, fêmeas, destinadas ao abate. O sangue coletado foi obtido da veia jugular externa, imediatamente antes do abate, utilizando tubos de vácuo estéreis de 9 mL devidamente identificados. Após coletado, o soro foi armazenado em microtubos a -20°C até a realização do teste sorológico. Amostras de tecido renal (n = 34), bexiga (n = 34), foram coletadas. Fragmentos de um grama foram usados para o processamento bacteriológico, e fragmentos de 5 g foram usados para o teste molecular. Estes foram congelados a -20 até serem processados.

#### *Diagnóstico Sorológico*

A presença de aglutininas anti-*Leptospira* sp. foram determinadas pela SAM (OIE, 2014), utilizando como antígenos uma coleção de 24 sorovares pertencentes a 17 sorogrupos patogênicos diferentes de cinco espécies, originários do Instituto Pasteur, na França, e fornecidos pelo Laboratório de Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, Brasil: *L. interrogans* serovars Copenhageni, Canicola, Autumnalis, Wolffii, Hardjoprajitno, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Kennewicki, Hebdomadis, Pyrogenes, Bratislava e Australis; Sorovares de *L. santarosai* Guaricura, Shermani e Canalzoni; Sorovares de *L. borgpetersenii* Javanica, Tarassovi, Ballum, Mini e Castellonis; Sorovares de *L. kirschneri* Grippytyphosa e Cynopteri; Sorovares de *L. noguchi* Panamá e Lousiana. Foi utilizado ponto de corte de 1:100, considerado positivo ao apresentarem aglutinação igual ou superior a 50%.

#### *Isolamento bacteriano*

As amostras de tecido renal e bexiga, foram maceradas usando pistilos estéreis para formar uma suspensão de 10% (peso/volume) em solução salina tamponada Sorensen estéril. A partir desta suspensão, inoculou-se 0,5 mL em 5 mL de EMJH semi-sólido (Disco, BD, Franklin Lakes, NJ, EUA), suplementado com antibiótico anfotericina B (0,05 mg / mL), 5-fluorouracil (1 mg / mL), fosfomicina (4 mg / mL), trimetoprim (0,2 mg / mL) e sulfametoxazol (0,4 mg / mL) (CHAKRABORTY et al. 2011). Os tubos inoculados foram então armazenados a 28°C numa câmara de incubação BOD. Após um período de 24 horas no meio enriquecido com antibiótico, as culturas foram diluídas em série (10<sup>1</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>) em meio semi-sólido de Fletcher (Difco, BD, Franklin Lakes, NJ, EUA). com 5- fluorouracilo (1 mg/mL) e incubou-se a 28°C. As culturas foram examinadas semanalmente para observar crescimento bacteriano durante 12 semanas usando microscopia de campo escuro.

#### *Deteção molecular de Leptospira sp.*

A extração de DNA de tecidos e culturas foi realizada com o kit de sangue e tecidos Dneasy (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante. Os iniciadores LipL32-45F (5'-AAG CAT TAC CGC TTG TGG TG-3 ') e Lip L32-286R (5'-GAA CTC CCA CCT TTC CAG CGA TT-3') foram utilizados para amplificar o gene LipL32, projetado por STODDARD et al. (2009), que tem como alvo o gene LipL32, específico para leptospiros patogênicas. As reações de sequenciamento foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por HAMOND et al. (2014), utilizando os iniciadores LipL32-45F e LipL32-286R (STODDARD et al., 2009) com o kit de sequenciamento Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Para eletroforese capilar, foram utilizados um analisador gênico de 3130xL e o polímero POP-7 (PLATT et al., 2007). A sequência foi alinhada com as cepas de Leptospira obtidas

do GenBank (Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia, Bethesda, MD, EUA) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), usando a ferramenta BLAST ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)). Uma árvore filogenética foi gerada usando o software Seaview4 (GOUY et al., 2010) e construída usando o método Bio Neighbour-joining e o modelo de inicialização Jukes e Cantor com 1.000 repetições. Isso foi visualizado através do FigTree v1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>). A reconstrução filogênica incluiu sequências de leptospiros para comparação.

#### *Análise estatística*

O teste exato de Fischer foi usado para comparar as proporções de amostras positivas de tecido renal e bexiga, tanto no PCR quanto para o crescimento bacteriano. Para avaliar a concordância entre os resultados das técnicas de MAT & PCR e MAT & Cultura, calculou-se o indicador Kappa. As análises foram feitas usando BioEstat 5.03 (AYRES et al. 2007), considerando um nível de significância de 5%.

## **RESULTADOS**

Dos 34 soros avaliados pela MAT, seis (17.6%) apresentaram reações positivas (Tabela 1 e 2). O título 100 foi predominante, com 66.6% (4/6) das sororeações, seguido do título de 200, com 33.4% (2/6). Os sorogrupos encontrados foram Autumnalis (33,3%, 2/6), Icterohaemorrhagiae (33,3%, 2/6) e Tarassovi (33,3%, 2/6)

Na análise molecular foram testadas 68 amostras provenientes de 34 animais, onde oito (23.5%) apresentaram DNA leptospírico. Destes animais, seis tiveram amostras positivas para o tecido renal e duas para bexiga (Tabela 1). A Tabela 3 mostra que o 6/34 (17.6%) amostras de tecido renal e 2/34 (5.8%) da bexiga apresentaram DNA, totalizando oito amostras. Não houve diferença estatística significativa entre as amostras ( $p = 0.141$ ).

Um amplicon do tecido renal apresentou 99% de identidade para a espécie patogênica *L. interrogans* (Figura 1).

De acordo com a Tabela 1, 2/34 (5.8%) animais foram positivos para o crescimento bacteriano, onde apenas um animal apresentou amostra exclusiva para o tecido renal. Ao todo, o crescimento foi observado em 3/68 (4.4%) amostras, sendo 2/34 (5.8%) tecido renal e 1/34 (2.9%) bexiga (Tabela 2). A comparação entre as amostras não mostrou diferença estatística significativa ( $p = 0.488$ ).

Observando a Tabela 3, percebe-se que duas amostras foram positivas para o MAT e o PCR, enquanto que para MAT e Cultura esse quantitativo foi de três. Usando como base o indicador Kappa, houve uma fraca correlação entre MAT e PCR ( $k = 0.150$ ;  $p = 0.436$ ) e entre MAT e Cultura ( $k = 0.543$ ;  $p = 0.005$ ).

## **DISCUSSÃO**

A sorologia identificou três sorogrupos predominantes, Icterohaemorrhagiae, Autumnalis e Tarassovi, semelhantes a resultados obtidos por HIGINO et al., (2012), SANTOS et al., (2012) e ARAÚJO NETO et al., (2010). A presença de anticorpos contra os sorogrupos Icterohaemorrhagiae e Tarassovi, pode estar relacionada ao compartilhamento do mesmo ambiente entre ovinos (*Ovis arie*), caprinos (*Capra hircus*), equinos (*Equus caballus*), suínos (*Sus scrofa domesticus*) e ratos (*Rattus norvegicus* e *Nectomys squamipes*), visto que de acordo com estudos anteriores existe uma correlação entre determinadas espécies e sorogrupos específicos (ALVES, 2000; RAMOS & SOUZA; LILENBAUM et al., 2007; ALVES et al., 2012; SANTOS et al., 2012; GOMES, 2013; PETRAKOVSKY & CARPINETTI & ANTONUCI, 2015; HAMOND et al., 2015).

O sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* foi o mais frequente nesse estudo, considerando a participação dos roedores na cadeia de transmissão, se faz necessário o controle do reservatório próximos a depósitos de ração no ambiente, restringir o acesso desses onde se cultiva ou é armazenado o volumoso (COSTA et al., 2017). Em relação ao sorogrupo *Autumnalis* inúmeros relatos o destaca como o mais frequente em pequenos ruminantes e levantam a hipótese de que esses podem ser possíveis hospedeiros de manutenção desses sorogrupo, nem mesmo o elevado acumulado de chuvas em períodos regulares na região foi suficiente para aumentar a resposta imunológica humoral dos animais, predominando títulos de anticorpos de 100, o que pode indicar adaptabilidade dessa espécie e possíveis portadores crônicos da doença (COSTA et al., 2016). O baixo número de animais soropositivos em estudos de prevalência na espécie na região Nordeste, sugere que esses caprinos criados na região semiárida, em sua maioria mestiços e com características mais rústicas, possam ser mais resistentes à leptospirose (SILVA et al., 2012; SANTOS et al., 2012; COSTA et al., 2016).

O ponto de corte utilizado (100) é outra questão a ser ponderada, uma vez que o título apresentado por determinadas espécies é um fato correlacionado com o nível de exposição ao longo da sua evolução (ADLER, 2015), surgindo a hipótese de se considerar interpretações distintas de acordo com o grau de adaptação da espécie e da realidade epidemiológica da região estudada (PICARDEAU, 2013), portando pontos de cortes abaixo de 100 para o diagnóstico da leptospirose devem ser considerados na medida em que os portadores crônicos são grandes responsáveis pela manutenção do agente no ambiente, reforçando a necessidade de constantes estudos sorológicos e tentativas de isolamento do agente nesta região. Pesquisa feita com ovinos por NOGUEIRA et al., (2020) o ponto de corte 50 na sorologia foi eficaz na detecção de portadores de ovinos em relação ao título 100 no semiárido brasileiro e, independentemente do material

utilizado na PCR, as maiores sensibilidades foram obtidas considerando esse ponto de corte, ou seja, menos resultados falso negativos foram obtidos.

Os achados positivos da PCR de órgãos e o isolamento bacteriano, revelaram a colonização de leptospiros no trato urinário (rim e bexiga) de caprinos reforçando a importância da transmissão por contato direto com urina de animal contaminado, como também a disseminação no rebanho por meio da contaminação do solo e da água (FAINE 1999, LILENBAUM, 2008). A presença do agente no sítio de localização representado pela bexiga, diferentemente do usual (tecido renal), demonstra a capacidade do agente em colonizar diferentes órgãos que até então foram poucos estudados. A PCR apesar de ser uma técnica mais laboriosa e alto custo, nos fornece diagnóstico direto, rápido e confiável. Recomenda-se a sua utilização após triagem com MAT tornando o diagnóstico mais preciso e o controle do rebanho mais viável e seguro (DIRECTOR et al., 2014a; COSTA et al., 2017). LILENBAUM et al. (2009) recomendaram o uso da soroglutinação microscópica como teste de rotina, com posterior PCR de urina para a detecção direta do DNA de leptospiros, portanto esta metodologia pode ser aplicada para a identificação de caprinos e ovinos portadores.

Desta forma, os dois métodos podem ser empregados no controle da leptospirose em pequenos ruminantes, visto que a baixa reatividade identificada comparada a outras regiões pode estar relacionada a baixa susceptibilidade a infecção e sororreatividade em animais nativos com alta rusticidade (SILVA et al., 2012; SANTOS et al., 2012, COSTA et al., 2016).

A bexiga é um reservatório temporário de urina (JUC et al., 2011) sendo um possível e importante sítio de colonização de leptospiros (SILVA et al., 2018). Trabalhos utilizando este órgão para detecção e isolamento de leptospiros são escassos e embora o trato urinário (rim, bexiga e urina) esteja automaticamente relacionado, pode demonstrar

resultados diferentes em relação a presença de DNA (NOGUEIRA et al., 2020). A presença de *Leptospira* sp. nas amostras retiradas do rim e da bexiga indica a capacidade do animal de liberar leptospiros (SASMAL et al., 2019).

O sequenciamento de DNA diretamente dos produtos da PCR foi possível em uma amostra de bexiga e houve 99% de similaridade com *L. interrogans* (Figura 1), resultado semelhante aos encontrados em ovinos por SILVA et al., (2018) e NOGUEIRA et al., (2020). A caracterização molecular (PCR) vem sendo utilizada em diversos estudos com pequenos ruminantes na Paraíba. COSTA et al., (2017) encontrou três animais positivos com a PCR em tecido renal; SILVA et al., (2018) obteve 44 animais positivos, sendo 54,9% no trato genital (útero, ovário e tuba uterina) e 4,4% no trato urinário (tecido renal e bexiga). NOGUEIRA et al., (2020) encontrou resultado de 69 animais positivos, utilizando amostras de fluido vaginal, urina, bexiga, rim, útero, tuba uterina, ovário e placenta.

No Brasil, os isolamentos bacterianos e caracterização molecular a partir de pequenos ruminantes, até o presente momento só demonstraram que foram isoladas quatro cepas de *Leptospira* sp. sendo uma no Rio de Janeiro pertencente ao sorogrupo Grippotyphosa (LILENBAUM et al., 2007). No Rio Grande do Sul o isolado foi identificado através de diagnóstico molecular como pertencente ao sorogrupo Noguchii e do sorovar Autumnalis (SILVA et al., 2007). Na Paraíba, em um estudo envolvendo 80 ovinos abatidos no Matadouro Público Municipal de Patos-PB, Isolou *Leptospira* sp. em duas amostras a partir de uma placenta e de uma ampola do ducto deferente (HIGINO et al., 2010). Outro estudo na Paraíba com 104 ovinos, conseguiu isolar *Leptospira* sp. em três amostras de fluido vaginal (NOGUEIRA et al., 2020).

As técnicas de diagnóstico utilizadas não obtiveram concordância estatística, como evidenciado em outros trabalhos (COSTA et al., 2016; SILVA et al., 2018)



fortalecendo a necessidade de associar os dois métodos para uma detecção confiável dos animais positivos, Posto que a MAT embora seja o teste sorológico mais utilizado para leptospirose, ter alta especificidade em nível de sorogrupo e recomendada pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2014), pode não apresentar título detectável em animais que tem leptospiras presentes nos rins e em outros órgãos, isso devido à baixa resposta imune que alguns sorovares provocam como também a adaptação das espécies a determinados sorovares (GAMAGE et al., 2011; OTAKA et al., 2012, DIRECTOR et al., 2014a).

A dispersão da leptospirose nos rebanhos pode acontecer através do trânsito de animais portadores, consistindo em uma importante forma de introdução do agente nos rebanhos. Na região semiárida é comum a prática de comercialização de pequenos ruminantes em feiras de vendas de animais, com a possibilidade de introdução de animais sem nenhum tipo de controle nas propriedades, além do uso de reprodutores compartilhados entre as propriedades (ALVES et al, 2017). O risco de introduzir a doença, com animais portadores crônicos assintomáticos aumenta a importância para o conhecimento da condição sorológica dos animais antes de serem introduzidos no rebanho, sugerindo a existência de vias de transmissão alternativas menos dependentes de fatores ambientais, bem como a identificação dos sorogrupos mais frequentes sugere a necessidade de melhoria das condições sanitárias e implementação de medidas de controle eficientes e direcionadas para as principais fontes de infecção (PIMENTA et al., 2019).

## **CONCLUSÃO**

Conclui-se que em condições de clima semiárido, a presença de roedores e as criações consorciadas são fatores de risco para manutenção e disseminação da *Leptospira*

sp. em rebanhos caprinos. A rusticidade dos animais do clima semiárido acarreta uma baixa sororreatividade na SAM, portanto é essencial o uso da MAT e PCR associados para o diagnóstico da leptospirose. Ampliação de estudos que busquem o isolamento e tipificação de sorogrupos circulantes em nossa região são necessários, servindo assim como base para a construção e aplicação de estratégias de profilaxia e controle desta doença.

#### COMITÊ DE ÉTICA

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa - CEP/ CSTR sob o 503 protocolo 58/2012. 35.

#### AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

#### REFERÊNCIAS

ADLER, B. History of leptospirosis and leptospira. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, Amsterdã, v. 387, p. 79-84, 2015. Available from: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-662-45059-8> >. Accessed: Fev. 29, 2020. doi: 10.1007 / 978-3-662-45059-8-1.

ALVES, J.R.A. et al. Epidemiological characterization and risk factors associated with leptospirosis and brucellosis in small ruminants sold at animal fair in the Sertão Region of Pernambuco State, a semiarid Region of Northeastern Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 38, n. 4, p. 1933-1946, jul./ago. 2017. Available from: < <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/26325> >. Accessed: Dez. 11, 2019. doi: 10.5433/1679-0359.2017v38n4p1933.

ALVES, C. J. et al. Influência dos fatores ambientais sobre a proporção de caprinos soro-reatores para a leptospirose em cinco centros de criação do Estado da Paraíba, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v. 63, n. 2, p. 11-8, 1996. Available from: <

[https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_nlinks&pid=S18081657201400010008600005&lng=en](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&pid=S18081657201400010008600005&lng=en) >. Accessed: Jan. 21, 2019.

ALVES, C.J. et al. Avaliação dos níveis de aglutininas anti-*Leptospira* spp. em cães no município de Patos-PB, Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.7, n.2, p.17-21, 2000. Available from: < <http://doi.editoracubo.com.br/10.4322/rbcv.2015.168> >. Accessed: Mai. 02, 2019. doi: 10.4322/rbcv.2015.168.

ALVES, C. J. et al. Caracterização epidemiológica e fatores de risco associados à leptospirose em ovinos deslanados do semiárido brasileiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 6, p. 523- 528, 2012. Available from: < [https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100736X2012000600009&script=sci\\_abstract&tlng=pt](https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100736X2012000600009&script=sci_abstract&tlng=pt) >. Accessed: Set. 22, 2019. doi: 10.1590/S0100-736X2012000600009.

ARAÚJO NETO, J.O. et al. Soroprevalência da leptospirose em caprinos da microrregião do Seridó Oriental, Estado do Rio Grande do Norte, Brasil, e pesquisa de fatores de risco. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.47, n.2, 2010. Available from: < <http://www.revistas.usp.br/bjvras/> >. Accessed: Mar. 05, 2020. doi: 10.1590/ S1413-95962010000200007.

AYRES, M. et al. Bioestat 5.0 **Aplicações estatísticas nas das ciências biomédicas**. ONG Mamiraua: Belém; PA, 364p, 2007. Available from: < <https://www.scienceopen.com/document?vid=485fe6d7-7c13-4d78-ac5e-2b0bb735b26c> >. Accessed: Jan. 13, 2020.

CAMPOS, A. P.et al. Seroprevalence and risk factors for leptospirosis in cattle, sheep, and goats at consorted rearing from the State of Piauí, northeastern Brazil. *Tropical Animal Health and Production*, Edinburgh, v. 49, n. 5, p. 899-907, 2017. Available from: < <https://link.springer.com/article/10.1007/s11250-017-1255-2> >. Accessed: Dez. 23, 2019. doi: 10.1007/s11250-017-1255-2.

CHAKRABORTY, A. et al. Novel combination of selective agents for isolation of *Leptospira* species, **Microbiology and Immunology**, v. 55, n. 7, p. 494–501, 2011. Available from: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.13480421.2011.00347.x> >. Accessed: Out. 01, 2019. doi: 10.1111/j.1348-0421.2011.00347.x.

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. Available from: < <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/20974> >. Accessed: Abr. 15, 2020. doi: 10.5433/1679-0359.2016v37n2p819.

COSTA, D.F. et al. Leptospirosis in native mexed-breed sheep slanghtered a semiarid region of Brazil. **Cienc. Rural**. v. 47, 2017. Available from: < [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S010384782017000200451](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010384782017000200451) >. Accessed: Abr. 12, 2020. doi: 10.1590/0103-8478cr20160563.

DIRECTOR, A. et al. Isolation of *Leptospira interrogans* Hardjoprajitno from vaginal fluid of a clinically healthy ewe suggests potential for venereal transmission. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 63, n. 9, p. 1234- 1236, 2014. Available from: < <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.065466-0> >. Accessed: Jun. 30, 2020. doi: 10.1099/jmm.0.065466-0.

ELLIS, W. A. **Animal leptospirosis**. Current Topics in Microbiology and Immunology, Tokyo, v. 387, n. 1, p. 99-137, 2015. Available from: < [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-45059-8\\_6](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-45059-8_6) >. Accessed: Set. 03, 2019. doi: 10.1007/978-3-662-45059-8\_6.

FAINE, S. et al. **Leptospira and Leptospirosis**. 2<sup>th</sup> ed. Melbourne: MediSci Press, 1999. 272 p.

GAMAGE, C.D. et al. Prevalence and carrier status of leptospirosis in smallholder dairy cattle and peridomestic rodents in Kandy, Sri Lanka. **Vector-Borne Zoonotic Dis**, v. 11, p. 1041–1047, 2011. Available from: < <https://www.liebertpub.com/doi/full/10.1089/vbz.2010.0153> >. Accessed: Out. 22, 2019. doi: 10.1089/vbz.2010.0153.

GOMES, M.J.P. **Gênero *Leptospira* spp**. Microbiologia Clínica Veterinária. Rio Grande do Sul: FAVET-UFRGS, 2013. Available from: < [www.ufrgs.br/labacvet/files/G%C3%AAnero%20Leptospira%204-2013-1.pdf](http://www.ufrgs.br/labacvet/files/G%C3%AAnero%20Leptospira%204-2013-1.pdf) >. Accessed: Jul. 21, 2019.

GOUY, M. et al. SeaView version: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building, **Molecular Biology and Evolution**, v. 27, n. 2, p. 221–224, 2010. Available from: < <https://academic.oup.com/mbe/article/27/2/221/970247> >. Accessed: Fev. 28, 2019. doi: 10.1093/molbev/msp259.

HAMOND, C. et al. Urinary PCR as na increasingly useful tool for an accurate diagnosis of leptospirosis in livestock, **Veterinary Research Communications**, v. 38, n. 1, p. 81–86, 2014. Available from: < <https://link.springer.com/article/10.1007/s11259-013-9582-x> >. Accessed: Abr. 14, 2019. doi: 10.1007/s11259-013-9582-x.

HAMOND, C. et al. Presence of leptospire on genital tract of mares with reproductive problems. **Vet. Microbiol.** v. 179, p. 264–269, 2015. Available from: < <https://www.sciencedirect.com/journal/veterinary-microbiology/vol/179/issue/3> >. Accessed: Abr. 14, 2019. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.06.014.

HIGINO, S. S. S. et al. Frequência de leptospirose em ovinos abatidos no Município de Patos, Paraíba. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, SP, v. 77, n. 3, p. 525-527, 2010. Available from: < [http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/arq/v77\\_3/higino.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/arq/v77_3/higino.pdf) >. Accessed: Nov. 11, 2019.

HIGINO, S.S.S. et al. Prevalência de leptospirose em caprinos leiteiros do semiárido paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.3, p.199-203, 2012. Available from: < [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-736X2012000300003&lng=pt&tlng=pt](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2012000300003&lng=pt&tlng=pt) >. Accessed: Out. 06, 2019. doi: 10.1590/S0100-736X2012000300003.

HIGINO S.S.S. & AZEVEDO S.S. Leptospirose em pequenos ruminantes: situação epidemiológica atual no Brasil. **Arq. Inst. Biol.** v. 81, n. 1, p. 86-94, 2014. Available from: < <http://www.scielo.br/pdf/aib/v81n1/1808-1657-aib-81-01-00086.pdf> >. Accessed: Out. 06, 2019. doi: 10.1590/S1808-16572014000100017.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, BRASIL. **Pesquisa da Pecuária Municipal**. 2019. Available from: < <http://www.scielo.br/pdf/aib/v81n1/1808-1657-aib-81-01-00086.pdf> >. Accessed: Jan. 14, 2020.

JUC, R. U. et al. Importância do sistema nervoso no controle da micção e armazenamento urinário. **Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde**, v.36, n.1, p. 55-60, Jan./Abr. 2011. Available from: < <https://www.portalnepas.org.br/abcs/article/view/76> >. Accessed: Mar. 23, 2020. doi: 10.7322/abcs.v36i1.76.

LILENBAUM, W.; SANTOS, M.R. Effect on management systems on the prevalence. **Veterinary Record**. v.138, n.3, p. 570-571, 1996. Available from: < <https://www.semanticscholar.org/paper/Effect-of-management-systems-on-the-prevalence-of-Lilenbaum-Santos/2fb08dde4ac54f61589b10ed613c1bf60cea16ca> >. Accessed: Abr. 12, 2019. doi: 10.1136/vr.138.23.570.

LILENBAUM, W. et al. A serological study on *Brucella abortus*, caprine-arthritis-encephalitis virus and *Leptospira* in dairy goats in Rio de Janeiro, Brazil. **The Veterinary Journal**, Amsterdã, v. 173, p. 408–412, 2007. Available from: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1090023305003047> >. Accessed: Abr. 20, 2019. doi: 10.1016/j.tvjl.2005.12.003.

LILENBAUM W. et al. Risk factors associated with leptospirosis in dairy goats under tropical conditions in Brazil. *Res. Vet. Sci.* v. 84, p. 14–21, 2008. Available from: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0034528807000872?via%3Dihub> >. Accessed: Abr. 25, 2019. doi: 10.1016/j.rvsc.2007.03.011.

LILENBAUM, W. et al. Identification of *Leptospira* spp. carriers among seroreactive goats and sheep by polymerase chain reaction. **Research in Veterinary Science**, London, v. 87, p. 16-19, 2009. Available from: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0034528808002804> >. Accessed: Abr. 28, 2019. doi: 10.1016/j.rvsc.2007.03.011.

MARTINS G. et al. Leptospirosis as the most frequent infectious disease impairing productivity in small ruminants in Rio de Janeiro, **Brazil. Trop. Anim. Health Prod.** v. 44, n. 4, p. 773-777, 2012. Available from: < <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11250-011-9964-4> >. Accessed: Mai. 11, 2019. doi: 10.1007/s11250-011-9964-4.

MARTINS, G.; LILENBAUM, W. Leptospirosis in sheep and goats under tropical conditions, **Tropical Animal Health and Production**, v. 46, n. 1, p. 11–17, 2014. Available from: < <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11250-013-0480-6> >. Accessed: Mai. 14, 2019. doi: 10.1007/s11250-013-0480-6.

NOGUEIRA, D. B. et al. Use of serological and molecular techniques for detection of *Leptospira* sp. carrier sheep under semiarid conditions and the importance of genital transmission route. **Acta Tropica**, 2020. Available from: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X20303818> >. Accessed: Jun. 01, 2020. doi: 10.1016/j.actatropica.2020.105497.

OIE. Leptospirosis: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. **World Organization for Animal Health**, Paris, 2014. Available from: < <https://www.oie.int/standard-setting/terrestrial-manual/> >. Accessed: Nov. 04, 2020.

OTAKA, D.Y. et al. Serology and PCR for bovine leptospirosis: herd and individual approaches. **Vet. Rec.** v.170, p. 338, 2012. Available from: < <https://veterinaryrecord.bmj.com/content/170/13/338.2> >. Accessed: Ago. 02, 2019. doi: 10.1136/vr.100490.

PETRAKOVSKY, J. et al. Prevalencia Serológica de *Leptospira* spp. en Cerdos Silvestres (*Sus scrofa*) en Bahía de Samborombón, provincia de Buenos Aires, República Argentina, en el Periodo 2013-2015. **Salud y Tecnología Veterinaria**, v. 3, n. 1, p. 23-27, 2015. Available from: < <https://revistas.upch.edu.pe/index.php/STV/article/view/2759> >. Accessed: Jul. 27, 2019. doi: 10.20453/stv.v3i1.2759.

PIMENTA, C.L.R.M. et al. Seroprevalence and predominant serogroups of *Leptospira* sp. in serological tests of ruminants in northeastern Brazil. **Semina: cienc. Agrar.** Londrina, v. 40, p. 1513–1522, 2019. Available from: < <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/34034> >. Accessed: Jan. 22, 2020. doi: 10.5433/1679-0359.2019v40n4p1513.

PICARDEAU, M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. **Médecine et Maladies Infectieuses**, Paris, n. 43, n. 1, p. 1-9, 2013. Available from: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0399077X12003198?via%3Dihub> >. Accessed: Nov. 16, 2019. doi: 10.1016/j.medmal.2012.

PLATT, A.R. et al. Improved DNA sequencing quality and efficiency using an optimized fast cycle sequencing protocol, *Biotechniques*, v. 43, n. 1, p. 58–62, 2007. Available from: < <https://www.future-science.com/doi/10.2144/000112499> >. Accessed: Oct. 20, 2019. doi: 10.2144/000112499.

PUGH D.G. & BAIRD A.N. **Sheep and goat medicine**. 2nd ed., Saunders, Maryland Heights. 621p. 2012.

RAMOS, A.C.F. et al. Influence of leptospirosis on reproductive performance of sows in Brazil. **Theriogenology**, v. 66, n. 4, p. 1021-1025, 2006. Available from: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X06001488?via%3Dihub> >. Accessed: Jun. 09, 2019. doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.08.028.

RIET-CORREA, B. et al. Sistemas produtivos de caprinocultura leiteira no semiárido paraibano: caracterização, principais limitantes e avaliação de estratégias de intervenção. **Pesq. Vet. Bras.** v. 33, n. 3, p. 345-352, março 2013. Available from: < [https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100736X2013000300012&script=sci\\_abstract&tlng=pt](https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100736X2013000300012&script=sci_abstract&tlng=pt) >. Accessed: Jun. 23, 2019. doi: 10.1590/S0100-736X2013000300012.

RIZZO, H. et al. Ocorrência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em caprinos do estado de Sergipe, Brasil, **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 18, p. 248-252, 2015. Available from: < [https://www.researchgate.net/profile/Diogo\\_Camara/publication/299495867\\_Selecao\\_de\\_reprodutores\\_e\\_matrizes\\_como\\_estrategia\\_para\\_melhoria\\_do\\_desempenho\\_produtivo\\_da\\_caprino-ovinocultura/links/570255d408ae9969f7027bcc/Selecao-de-reprodutores-e-matrizes-como-estrategia-para-melhoria-do-desempenho-produtivo-da-caprino-ovinocultura.pdf#page=248](https://www.researchgate.net/profile/Diogo_Camara/publication/299495867_Selecao_de_reprodutores_e_matrizes_como_estrategia_para_melhoria_do_desempenho_produtivo_da_caprino-ovinocultura/links/570255d408ae9969f7027bcc/Selecao-de-reprodutores-e-matrizes-como-estrategia-para-melhoria-do-desempenho-produtivo-da-caprino-ovinocultura.pdf#page=248) >. Accessed: Nov. 18, 2019.

SANTOS J.P. et al. Seroprevalence and risk factors for Leptospirosis in goats in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. **Trop. Anim. Health Prod.** v. 44, p. 101-106, 2012. Available from: < <https://link.springer.com/article/10.1007/s11250-011-9894-1> >. Accessed: Jun. 30, 2019. doi: 10.1007/s11250-011-9894-1.



SASMAL, I. et al. Leptospirosis in urban and suburban american black Bears in western north carolina. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 55, n. 1, 2019. Available from: < <https://bioone.org/journals/journal-of-wildlife-diseases/volume-55/issue-1/2017-10-263/LEPTOSPIROSIS-IN-URBAN-AND-SUBURBAN-AMERICAN-BLACK-BEARS-URSUS-AMERICANUS/10.7589/2017-10-263.short> >. Accessed: Abr. 08, 2020. doi: 10.7589/2017-10-263.

SILVA A.F. et al. High frequency of genital carriers of *Leptospira* sp. in sheep slaughtered in the semi-arid region of northeastern Brazil. **Trop Anim Health Prod.** v. 51, n. 43, 2018. Available from: < <https://link.springer.com/article/10.1007/s11250-018-1657-9> >. Accessed: Mai. 10, 2020. doi: 10.1007/s11250-018-1657-9.

SILVA, E.F. et al. Isolation of *Leptospira* Noguchii from sheep. **Veterinary Microbiology**, v.121, p.144-149, 2007. Available from: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113506004652?via%3Dihub> >. Accessed: Mar. 24, 2020. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.11.010.

SILVA, G.C.P. **Caracterização epidemiológica de brucelose e leptospirose de pequenos ruminantes dos estados de Sergipe, Bahia, Ceará e Paraíba.** 2015. 112. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Câmpus Jaboticabal, São Paulo. 2015.

SILVA R.C. et al. Frequency of *Leptospira* spp. in sheep from Brazilian slaughterhouses and its association with epidemiological variables. **Pesq. Vet. Bras.** V. 32, n. 3, p. 194-198, 2012. Available from: < [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100736X2012000300002&lang=en](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100736X2012000300002&lang=en) >. Accessed: Ago. 03, 2019.

STODDARD, R.A. et al. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene, **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 64, n. 3, p. 247–255, 2009. Available from: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0732889309001059?via%3Dihub> >. Accessed: Ago. 01, 2019. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2009.03.014.

TOPAZIO, J. et al. Antibodies to *Leptospira interrogans* in goats and risk factors of the disease in Santa Catarina (West side), Brazil. **Research in Veterinary Science**, v.99, p.53-57, 2015. Available from: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0034528815000399?via%3Dihub> >. Accessed: Jan. 21, 2020. doi: 10.1016/j.rvsc.2015.01.014.

VANASCO, N. B. et al. Clinical characteristics and risk factors of human leptospirosis in Argentina (1999-2005). **Acta Tropica**, Amsterdã, v. 107, p. 255-258, 2008. Available from: <



<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0001706X08001812?via%3Dihub> >. Accessed: Mai. 10, 2019. doi: 10.1016/j.actatropica.2008.06.007.

#### DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflitos de interesse. Os patrocinadores fundadores não tiveram nenhum papel no desenho do estudo; na coleta, análise ou interpretação dos dados; na redação do manuscrito; ou na decisão de publicar os resultados.

#### CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

Os autores contribuíram igualmente para o manuscrito.

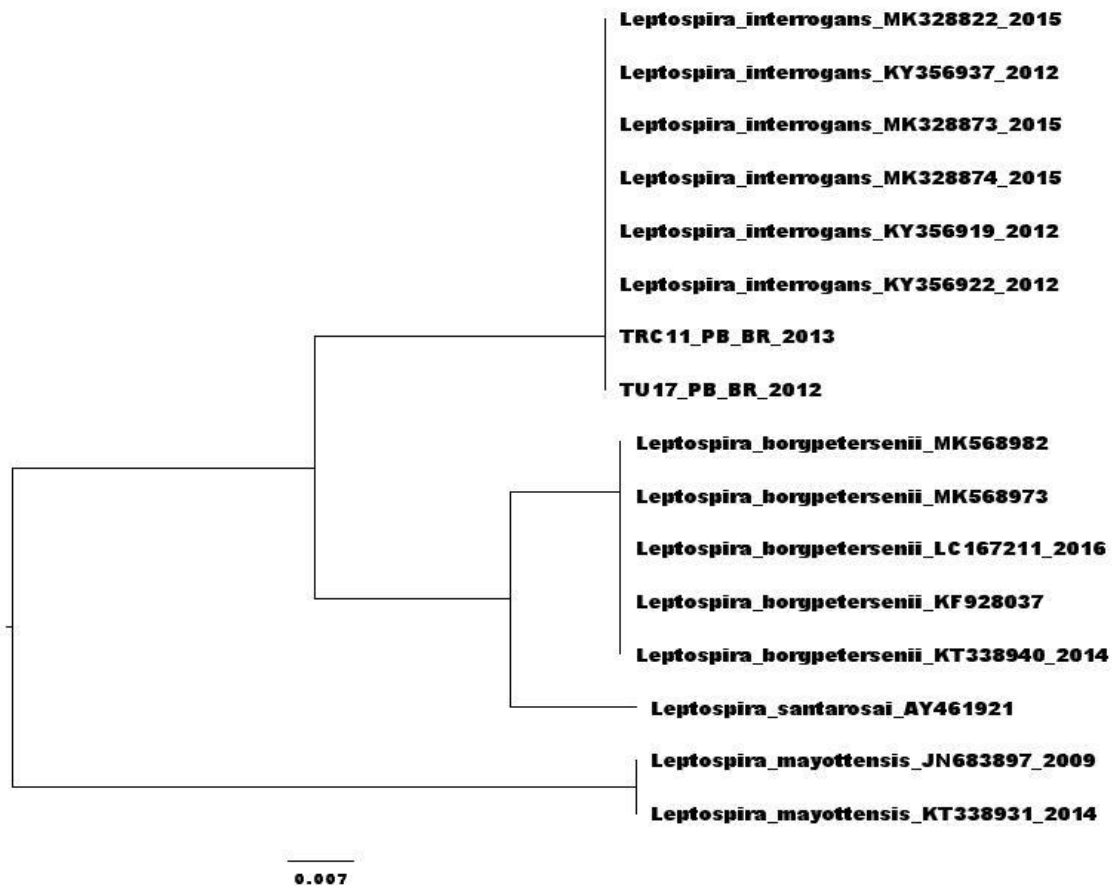


Figure 1. A árvore filogenética construída pelo método Neighbor-Joining e modelo Jukes-Cantor, bootstrap com 1000 repetições. ▲ Amostras sequenciadas

Identificação Animal	SAM		PCR Órgãos		Cultura	
	100	200	Rim	Bexiga	Rim	Bexiga
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	+	-	-
6	Tarassovi	-	-	-	-	-
7	Autumnalis	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-
9	-	Ictero*	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
11	-	-	+	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-
19	-	-	+	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-
21	-	-	+	+	-	-
22	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-
25	Autumnalis	-	+	-	+	-
26	-	-	-	-	-	-
27	-	-	+	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-
29	Tarassovi	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-
31	-	-	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-	-
34	-	Ictero*	+	-	+	+
Total	3	2	6	2	2	1

Ictero\*: Icterohaemorrhagiae

Tabela 1: Resultados obtidos de *Leptospira* sp. utilizando diferentes técnicas diagnosticas (MAT, PCR e Cultura de *Leptospira* sp.) em cabras criadas em condições de ambiente semiárido.

AMOSTRA	Total of samples	PCR		Crescimento Cultura	
		Nº positive samples	Frequência (%)	Nº positive samples	Frequência (%)
Tecido Renal	34	6	17.6	2	5.8
Bexiga	34	2	5.8	1	2.9

Tabela 2: Resultados da PCR de tecidos do trato urinário e Crescimento de *Leptospira* sp. em cabras criadas em condições de ambiente semiárido.

MAT	PCR			Crescimento Cultura		
	Positivo	Negativo	Total (%)	Positivo	Negativo	Total (%)
Positivo	2	4	6	3	4	7
Negativo	6	22	28	0	27	27
Total (%)	8	26	34	3	31	34

Tabela 3: Porcentagem de animais positivos de acordo com o método diagnóstico utilizado em cabras criadas em condições de ambiente semiárido.

## **CAPÍTULO II:**

### **Achados sorológico, molecular e isolamento de *Leptospira* sp. do trato urinário de carneiros portadores mantidos em condições de ambiente semiárido**

Laysa Mayara Soares Brito Rocha; Davidianne de Andrade Moraes, Rafael Rodrigues Soares, Aline Ferreira da Silva; João Pessoa Araújo Júnior, Camila Dantas Malossi, Leila Sabrina Ullmann, Diego Figueiredo da Costa, Maria Luana Cristiny Rodrigues Silva, Severino Silvano dos Santos Higino, Sergio Santos de Azevedo, Clebert José Alves

Trabalho a ser submetido à revista Ciência Rural

(Qualis A2)

**Achados sorológico, molecular e isolamento de Leptospira sp do trato urinário de carneiros portadores mantidos em condições de ambiente semiárido.**

**Serological and molecular findings and isolation of Leptospira sp. of the urinary tract of carrier sheep kept in semi-arid conditions**

Laysa Mayara Soares Brito Rocha<sup>1</sup> Davidianne de Andrade Moraes<sup>1</sup> Rafael Rodrigues Soares<sup>1</sup> Aline Ferreira da Silva; João Pessoa Araújo Júnior<sup>2</sup>, Camila Dantas Malossi<sup>2</sup>, Leila Sabrina Ullmann<sup>2</sup>, Diego Figueiredo da Costa<sup>3</sup>, Maria Luana Cristiny Rodrigues Silva<sup>1</sup> Severino Silvano dos Santos Higino<sup>1</sup> Sergio Santos de Azevedo<sup>1</sup> Clebert José Alves<sup>1</sup>

\*E-mail for correspondence: clebertja@uol.com.br

<sup>1</sup>Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Av. Universitária, no number, Santa Cecília, Patos, Paraíba 58707-110, Brazil.

<sup>2</sup>Universidade Estadual Paulista (Unesp), Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro, s/n, Campus de Botucatu, Botucatu, SP 18618-687, Brazil.

<sup>3</sup>Department of Veterinary Sciences, UFPB, Federal University of Paraíba, Paraíba, Brazil,

<https://orcid.org/0000-0002-2698-2060>

**RESUMO:** *A leptospirose é uma doença bacteriana, zoonótica, de impacto econômico e de saúde pública que pode acometer os ovinos, causando-lhes transtornos reprodutivos. Tornando-se o isolamento de leptospiros de grande importância do ponto de vista epidemiológico, por permitir a identificação dos sorotipos circulantes em determinada região, colaborando com as ações de controle da infecção. Embora alguns estudos em ovinos tenham indicado a colonização do trato urinário por leptospiros, mais estudos são necessários para esclarecer o papel dos portadores nessa espécie. Desta forma, o objetivo do trabalho foi avaliar os achados sorológicos, moleculares e isolamento de leptospiros patogênicos do trato urinário (tecido renal e bexiga) de ovinos machos. Foram utilizadas 24 ovinos adultos destinadas ao abate. Amostras renais (n = 24), bexiga (n = 24), foram coletadas para isolamento do agente e detecção molecular de DNA de *Leptospira* sp. e amostras de sangue (n = 24) para teste sorológico. O teste molecular foi realizado por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), e o teste sorológico foi realizado pelo teste microscópico de soro aglutinação (MAT). As amostras com amplificação de DNA foram submetidas ao sequenciamento genético. No total, DNA de leptospira foi encontrado nos tecidos de 14/24 (58,3%) ovinos machos. Em 4/24 (16,0%) amostras do tecido renal e 10/24 (41,6%) bexiga, foi detectado o DNA da leptospira, com diferença significativa ( $p < 0,001$ ). Os genes de três amostras de bexiga foram sequenciados e demonstraram 99% de similaridade com *Leptospira interrogans*. Os resultados reforçam a importância do trato urinário, especialmente a bexiga como sítio de colonização das leptospiros além do tecido renal.*

**Palavras-chave:** *Ovinos, leptospirose, isolamento, trato urinário, detecção molecular, epidemiologia, semiárido.*



**ABSTRACT:** *Leptospirosis is a bacterial, zoonotic disease with an economic impact and public health that can affect sheep, causing reproductive disorders. Becoming the isolation of leptospire of great importance from an epidemiological point of view, as it allows the identification of serotypes circulating in a given region, collaborating with the actions of infection control. Although some studies in sheep have indicated the colonization of the urinary tract by leptospire, further studies are needed to clarify the role of carriers in this species. The work was to evaluate serological molecular findings and isolation of pathogenic leptospire from the urinary tract of male sheep. 24-adult sheep used for slaughter. Renal samples (n = 24), bladder (n = 24), were collected for isolation of the agent and molecular detection of *Leptospira* sp. and blood samples (n = 24) for serological testing. The molecular test was performed using the polymerase chain reaction (PCR), and the serological test using the microscopic serum agglutination test (MAT). Samples with DNA amplification were subject to genetic sequencing. In total, leptospira DNA was found in the tissues of 14/24 (58.3%) male sheep. In 4/24 (16.0%) samples of renal tissue and 10/24 (41.6%) bladder, leptospira DNA was detected, with a significant difference ( $p < 0.001$ ). The genes of three bladder samples were sequenced and demonstrated 99% similarity to *Leptospira interrogans*. The results reinforce the importance of the urinary tract, especially the bladder as a site of colonization of leptospire in addition to renal tissue.*

**Keywords:** *Sheep, leptospirosis, isolation, urinary tract, molecular detection, epidemiology, semiarid.*

## **INTRODUÇÃO**

A ovinocultura é um segmento econômico de grande valor para a pecuária brasileira, principalmente para a região Nordeste, estando situada em uma faixa abrangida por mais de 30% de área semiárida (GIRARDI & ROSA, 2011), é uma das principais atividades econômica, sendo bastante ligada a pequenos produtores. O Brasil tem um efetivo de cerca de 18 milhões de ovinos, concentrados a grande maioria na Região Nordeste (IBGE, 2019). As falhas de manejo, falta de programa sanitário, assistência técnica e organização dos produtores, fazem com que essa atividade tenha baixa produtividade (COELHO et al., 2011; SOUSA, 2007).

Nas criações ovinas, devido à baixa tecnificação aplicada à produção em nossa região, as enfermidades infecciosas ganham destaque com relação à queda da produtividade (MARTINS et al., 2012), sendo a leptospirose de grande relevância, tendo em vista sua ampla disseminação e os prejuízos trazidos, como abortamentos, nascimento de crias fracas e prematuras, além da queda na produção de leite (ELLIS, 2015), sendo o seu principal impacto o comprometimento do desempenho reprodutivo dos rebanhos acometidos (ALVES, 2012). Dentre os fatores responsáveis pela baixa produtividade no rebanho ovino, uma parcela de 10% tem sido atribuída ao abortamento, cujas principais causas são de origem sanitária e nutricional (SILVA & SILVA, 1983; SANTOS et al., 2009). A mortalidade perinatal de cordeiros é um dos fatores que limitam a eficiência biológica e econômica dos sistemas de produção ovina (NÓBREGA JÚNIOR et al., 2005), existem relatos de criadores sobre a ocorrência de abortamento, natimortalidade e mortalidade de cordeiros na primeira semana pós-parto.

A leptospirose é uma doença mundialmente difundida e que pode acometer várias espécies, inclusive o homem (ADLER & MOCTEZUMA, 2010). A doença pode se manifestar na forma aguda, subaguda e crônica, sendo a última a mais descrita, por ser responsável por altas perdas econômicas (ELLIS, 2015).

Embora os ovinos apresentem menor sensibilidade a infecção, a disseminação entre eles é um fato real e crescente, sendo agravado em propriedades que adotam atividades consorciadas com outras espécies animais (ARAÚJO NETO, 2005; RIZZO et al., 2011; COSTA et al.; 2017), principalmente bovinos, onde os ovinos adquirem a infecção pela urina e bebedouros coletivos. Podendo também ocorrer transmissões entre ovinos, seja por contato direto ou contato com fluidos vaginais, placenta e contatos sexuais (FERNANDES, 2009). Além da baixa sororreatividade em ovinos mestiços (COSTA et al., 2016), que correspondem a 90% do plantel do semiárido Nordeste, e apresentam alta rusticidade (SILVA & ARAÚJO, 2000; CESAR et al, 2004)

A pluviosidade acima de 500mm vem sendo relacionada e bem estabelecida quanto a frequência de animais sororreativos (ALVES et al., 1996; VANASCO et al., 2008), mas estudo realizado por NOGUEIRA et al., (2020) com ovinos na região semiárida da Paraíba, demonstrou uma maior proporção de animais positivos no período de escassez chuvosa, o que ressalta a importância de animais portadores assintomáticos no rebanho como forma de manutenção da doença (COSTA et al., 2016).

A prevalência da *Leptospira* sp. em rebanhos ovinos no Brasil varia entre 0,7 a 34,6% (HIGINO & AZEVEDO et al., 2014). A prevalência entre os estados brasileiros tem demonstrado grande variação. No Rio Grande do Sul foi encontrado uma prevalência de 34,26% (SILVA et al., 2007), Rio de Janeiro 13,7% (LILENBAUM et al., 2009), no Maranhão 31,93% (CARVALHO et al., 2012), na Paraíba 7,5% (HIGINO et al., 2010), 5,41% (ALVES et al., 2012), 11,2% (COSTA et al., 2016), 8,2% (COSTA et al., 2017), 19,3% (SILVA et al., 2018). NOGUEIRA et al., (2020) utilizou dois pontos de corte para determinar a prevalência (1:100 e 1:50), com resultados de 11,5% e 25%, respectivamente.

O método de diagnóstico mais utilizado é o teste de aglutinação microscópica (MAT), que utiliza culturas vivas de *Leptospira* sp. como antígenos (MARTINS E LILENBAUM, 2014). Embora amplamente utilizado e com alta especificidade, ele é um teste deficiente quando usado sozinho visto que a ausência de níveis detectáveis de anticorpos séricos em algumas espécies animais torna-o menos sensível (ELLIS, 2015).

Devido as deficiências apresentadas na MAT, outros métodos de diagnósticos devem ser associados, como o isolamento e caracterização molecular (PCR) de leptospiras sendo de grande importância do ponto de vista epidemiológico. O isolamento de leptospira permite a identificação dos sorovares circulantes em determinada região, o que tem implicação direta nas ações de controle da infecção (FREITAS et al., 2004; HIGINO et al., 2010). O PCR embora seja laborioso e de custo mais elevado, permite diagnóstico direto do DNA leptospírico, nos dando um resultado mais confiável e preciso, indicado como método de eleição após triagem com a MAT (LILENBAUM et al 2009; DIRECTOR et al., 2014b). Pesquisas realizadas por COSTA et al., 2017; SILVA et al., (2018) e NOGUEIRA et al., (2020) utilizando a MAT e PCR demonstram a importância de associar as duas técnicas e de como a PCR é uma técnica sensível mesmo em animais negativos.

Tendo em vista a relevância dessa enfermidade nos rebanhos de pequenos ruminantes, responsável por enormes perdas econômicas, devido suas características produtivas e reprodutivas, por ser também uma importante zoonose com interesse para saúde pública (ELLIS, 2015), foi estruturado o trabalho de pesquisa que teve como objetivo avaliar os achados sorológicos, moleculares e isolamento de leptospiras patogênicas do trato urinário (tecido renal e bexiga) de ovinos machos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### *Área de estudo e coleta de materiais biológicos*

O estudo foi realizado no matadouro municipal de Patos, mesorregião do Sertão do estado da Paraíba, localizada na região semiárida do Nordeste do Brasil (latitude: 07 ° 01 ' 28 " S; longitude: 37 ° 16 ' 48 " W), pertencente ao bioma caatinga, estando 245m acima do nível do mar, apresentando temperatura média anual de 25,5°C e 728mm de pluviosidade. A cidade de Patos tem 472,892 Km<sup>2</sup> de área territorial e efetivo de 3.098 cabeças de caprinos. Foram utilizados 24 ovinos adultos, machos, destinadas ao abate. Amostras de sangue foram obtidas da veia jugular externa, imediatamente antes do abate, utilizando tubos de vácuo estéreis de 9 mL identificados adequadamente. Após o soro coletado, foi armazenado em microtubos a - 20 ° C até a realização do teste sorológico. Amostras de tecido renal (n = 24), bexiga (n = 24), foram coletadas. Fragmentos de um grama foram usados para o processamento bacteriológico, e fragmentos de 5 g foram usados para o teste molecular. As amostras foram congeladas a -20 até serem processadas.

### *Diagnóstico Sorológico*

A presença de anti-*Leptospira* sp. As aglutininas foram determinadas por MAT (OIE, 2014), utilizando como antígenos uma coleção de 24 sorovares pertencentes a 17 sorogrupos patogênicos diferentes de cinco espécies, originários do Instituto Pasteur, na França, e fornecidos pelo Laboratório de Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, Brasil: *L. interrogans* serovars Copenhageni, Canicola, Autumnalis, Wolffii, Hardjoprajitno, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Kennewicki, Hebdomadis, Pyrogenes, Bratislava e Australis; Sorovares de *L. santarosai* Guaricura, Shermani e Canalzoni; Sorovares de *L. borgpetersenii* Javanica, Tarassovi, Ballum, Mini e Castellonis; Sorovares de *L. kirschneri* Grippotyphosa e Cynopteri;

Serovares de *L. noguchi* Panamá e Louisiana. Foi utilizado ponto de corte de 1:100, considerado positivo ao apresentarem aglutinação igual ou superior a 50%.

#### *Isolamento bacteriano*

As amostras de tecido renal e bexiga, foram maceradas usando pistilos estéreis para formar uma suspensão de 10% (peso / volume) em solução salina tamponada Sorensen estéril. A partir desta suspensão, inoculou-se 0,5 mL em 5 mL de EMJH semi-sólido (Disco, BD, Franklin Lakes, NJ, EUA), suplementado com antibiótico anfotericina B (0,05 mg / mL), 5-fluorouracil (1 mg / mL), fosfomicina (4 mg / mL), trimetoprim (0,2 mg / mL) e sulfametoxazol (0,4 mg / mL) (CHAKRABORTY et al. 2011). Os tubos inoculados foram então armazenados a 28 ° C numa câmara de incubação BOD. Após um período de 24 horas no meio enriquecido com antibiótico, as culturas foram diluídas em série (10<sup>1</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>) em meio semi-sólido de Fletcher (Difco, BD, Franklin Lakes, NJ, EUA). com 5- fluorouracilo (1 mg / mL) e incubou-se a 28. As culturas foram examinadas semanalmente para observar crescimento bacteriano durante 12 semanas.

#### *Detecção molecular de Leptospira sp.*

A extração de DNA de tecidos e culturas foi realizada com o kit de sangue e tecidos Dneasy (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante. Os iniciadores LipL32-45F (5'-AAG CAT TAC CGC TTG TGG TG-3 ') e Lip L32-286R (5'-GAA CTC CCA CCT TTC CAG CGA TT-3') foram utilizados para amplificar o gene LipL32, projetado por STODDARD et al. (2009), que tem como alvo o gene LipL32, específico para leptospiros patogênicas. As reações de sequenciamento foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por HAMOND et al. (2014), utilizando os iniciadores LipL32-45F e LipL32-286R (STODDARD et al., 2009) com o kit de

sequenciamento Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Para eletroforese capilar, foram utilizados um analisador gênico de 3130xL e o polímero POP-7 (PLATT et al., 2007). A sequência foi alinhada com as cepas de *Leptospira* obtidas do GenBank (Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia, Bethesda, MD, EUA) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), usando a ferramenta BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Uma árvore filogenética foi gerada usando o software Seaview4 (GOUY et al., 2010) e construída usando o método Bio Neighbour-joining e o modelo de inicialização Jukes e Cantor com 1.000 repetições. Isso foi visualizado através do FigTree v1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>). A reconstrução filogenética incluiu sequências de leptospiros para comparação.

#### *Análise estatística*

Foi realizado o teste exato de Fischer para comparar as proporções de amostras positivas de tecido renal e bexiga, tanto no PCR quanto para o crescimento bacteriano. As análises foram feitas usando BioEstat 5.03 (AYRES et al. 2007), considerando um nível de significância de 5%.

## **RESULTADOS**

Nenhuma amostra testada apresentou anticorpos anti-*Leptospira* pela MAT (Tabela 1).

Neste estudo, o PCR detectou leptospiral DNA no tecido renal e bexiga em 14 de 24 (58,33%) carneiros. Destes, quatro tiveram amostras positivas apenas para o tecido renal e dez para a bexiga (Tabela 1). No geral, 16,66% de tecido renal (4/24) e 41,66%

amostras de bexiga (10/24) foram positivas no PCR (Tabela 2). Estatisticamente, não houve diferença significativa entre as duas amostras ( $p = 0.056$ ).

O sequenciamento foi realizado em três produtos do PCR da bexiga, mostrando 99% de similaridade com *Leptospira interrogans*. (Figura 1).

As culturas mantidas no período de 12 meses apresentaram crescimento em 12.5% (3/24) dos animais. Apenas uma amostra foi exclusiva para o tecido renal, com a mesma quantidade sendo observada para a bexiga (Tabela 1). A Tabela 2 mostra que tanto o tecido renal quanto a bexiga apresentaram duas amostras com crescimento bacteriano, cuja frequência foi de 8.3%. Não houve diferença estatística significativa ( $p = 0.695$ ).

## **DISCUSSÃO**

Os baixos índices pluviométricos durante o período de coletas do projeto podem ter contribuído para os resultados encontrados na SAM para titulação 100, sabendo-se que nessa época são escassas as condições ambientais favoráveis para a disseminação da infecção (FAINE et al., 1999). A leptospirose é uma doença mundialmente distribuída e sua incidência tem forte associação com períodos de alta pluviosidade (ALVES et al. 1996, VANASCO et al., 2008), contudo, resultados apresentados por NOGUEIRA et al., (2020) observou um aumento de animais positivos no período de escassez chuvosa comparado ao período de maior índice pluviométrico. Outro fator a ser ponderado é a rusticidade dos animais nativos que apresentam baixa sororreatividade e correspondem a 90% do plantel ovino do semiárido Nordeste, (CESAR et al., 2004; COSTA et al., 2016) enfatizando a necessidade de aplicar um ponto de corte menor na rotina sorológica na região semiárida do Nordeste Brasileiro, pois o título apresentado por determinadas espécies é um fato correlacionado com o nível de exposição ao longo da sua evolução



(ADLER, 2015), admitindo-se a hipótese de se considerar interpretações distintas de acordo com o grau de adaptação da espécie e da realidade epidemiológica da região estudada (PICARDEAU, 2013).

A SAM é um método de diagnóstico muito utilizado, tem alta especificidade em nível de sorogrupo, recomendada pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2014), mas dependendo do órgão que as bactérias estão colonizando, a resposta imune do organismo, a adaptabilidade de algumas espécies a determinados sorovares, não há título de anticorpos detectáveis, levando a um resultado falso negativo (GAMAGE et al., 2011; OTAKA et al., 2012, DIRECTOR et al., 2014b).

O PCR embora seja uma técnica mais laboriosa e onerosa, é uma forma de diagnóstico rápido e confiável, se tornando uma opção para uso após a triagem com a MAT, reduzindo os custos e aumentando a eficiência na detecção dos animais positivos (DIRECTOR et al., 2014b; COSTA et al., 2017). Os resultados demonstram que se utilizado apenas a MAT para detectar a presença de animais soro reagentes, a possibilidade de um resultado falso negativo não poderia ser descartada, considerando que para o título 100 os animais testados resultaram negativos, enquanto a PCR dos órgãos revelaram a presença de DNA leptospiral em 14 amostras do trato urinário. Portanto fica evidente a necessidade de associar os dois métodos de diagnóstico para identificar com maior precisão os animais positivos.

COSTA et al., (2017) trabalhando com 49 ovelhas, com um total de 98 amostras de trato urinário (Rim e Urina); SILVA et al., (2018) trabalhando com 57 ovelhas, com um total de 114 amostras de trato urinário (Rim e Bexiga) e NOGUEIRA et al., (2020) trabalhando com 104 ovelhas, com um total de 312 amostras de trato urinário (Urina, Rim e Bexiga) encontraram uma prevalência com a PCR de 3,06%, 4,4% e 51,5%, respectivamente, no trato urinário de ovinos na Paraíba. Deste modo os resultados

encontrados nesse estudo (Tabela 2) foram superiores. O tecido renal e a bexiga, podem albergar leptospiros, pelo fato de pertencerem ao trato urinário, no qual existe pouca especialização regional do sistema imune adaptativo por possuir poucos tecidos linfoides associados à mucosa (ABBAS & LICHTMAN & PILLAI, 2012), e/ou por estarem em contato direto com a urina, no caso do tecido renal e da bexiga, onde já foi constatada presença de DNA leptospírico através da PCR em trabalhos realizados com ovinos (COSTA et al., 2017; SILVA et al., 2018; NOGUEIRA et al., 2020).

O sequenciamento do DNA leptospiral de três amostras de bexiga identificou *L. Interrogans*, revela um achado importante visto que vários sorogrupos dessa espécie são comumente encontrados, além de causarem quadros agudos da doença em ovinos, que resultam em grandes perdas econômicas (ADLER & MOCTEZUMA, 2010; MARTINS & LILENBAUM, 2014).

O isolamento de leptospiros observado, indica que ovinos podem ser fontes de infecção do agente, segundo HIGINO et al. (2010), o animal pode estar infectado, porém não apresenta título de anticorpos suficiente para caracterizar uma reação de soroaglutinação positiva, o que foi verificado, com a ausência de animais sororetadores. Segundo DIRECTOR (2014a), há poucas pesquisas que relatam o isolamento de *Leptospira* em ovinos infectados naturalmente. No Brasil, são poucos os relatos de isolamento de leptospiros e seu papel na etiologia da leptospirose, o que reforça a necessidade da condução de estudos visando o isolamento do agente na região e a investigação de sua patogenicidade.

## **CONCLUSÃO**

Conclui-se que as *Leptospiras* estão presentes nos rebanhos ovinos do semiárido Nordeste Brasileiro e esses podem apresentar sororreatividade baixa devido condições climáticas e rusticidade dos animais dessa região, portanto recomenda-se o uso da MAT e PCR associados para o diagnóstico da leptospirose. É necessário a ampliação de estudos que busquem o isolamento e tipificação de sorogrupos circulantes nessa região, servindo de base para a construção e aplicação de estratégias de profilaxia e controle desta doença. De acordo com os resultados obtidos sugere-se a aplicação do ponto de corte 50 para animais mantidos no clima semiárido.

#### COMITÊ DE ÉTICA

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa - CEP/ CSTR sob o protocolo 58/2012. 35.

#### AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

#### REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K. et al. **Imunologia celular e molecular**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. Capítulo 3, Imunidade inata; p. 82-5.

ADLER, B.; MOCTEZUMA, A.P. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.140, n.3-4, p.287-296, 2010. Available from: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113509001163> >. Accessed: 23 abr. 2020. doi:10.1016/j.vetmic.2009.03.012.

ADLER, B. History of leptospirosis and leptospira. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, Amsterdã, v. 387, p. 79-84, 2015. Available from: <

<https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-662-45059-8> >. Accessed: 31 Jan. 2020. doi: 10.1007 / 978-3-662-45059-8-1.

ALVES, C. J. et al. Influência dos fatores ambientais sobre a proporção de caprinos soro-reatores para a leptospirose em cinco centros de criação do Estado da Paraíba, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v. 63, n. 2, p. 11-8, 1996. Available from: < [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_nlinks&pid=S1808-1657201400010008600005&lng=en](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&pid=S1808-1657201400010008600005&lng=en) >. Accessed: 19 Out. 2019.

ALVES, C.J. et al. Caracterização epidemiológica e fatores de risco associados à leptospirose em ovinos deslançados do semiárido brasileiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.6, p.523-528, 2012. Available from: < [https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-736X2012000600009&script=sci\\_abstract&lng=pt](https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-736X2012000600009&script=sci_abstract&lng=pt) >. Accessed: 22 Mar. 2020. doi: 10.1590/S0100-736X2012000600009.

ARAÚJO NETO, J. O. **Isolamento de Leptospira spp. a partir do trato genital de ovelhas abatidas no matadouro público de Patos-PB, Estado da Paraíba, Brasil.** 2005. 58f. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Campina Grande, Patos, Paraíba, 2005.

AYRES, M. et al. **Bioestat 5.0 Aplicações estatísticas nas das ciências biomédicas.** ONG Mamiraua: Belém; PA, 364p, 2007. Available from: < <https://www.scienceopen.com/document?vid=485fe6d7-7c13-4d78-ac5e-2b0bb735b26c> >. Accessed: 02 Jul. 2019.

CARVALHO, S.M. **Avaliação das alterações em rim, fígado e pulmões de ovinos infectados por leptospiras.** 74f. Tese (Doutorado) Programa de pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2012.

CEZAR M.F., et al. **Avaliação de parâmetros fisiológicos de ovinos Dorper, Santa Inês e seus mestiços perante condições climáticas do trópico Semi-Árido nordestino.** Ciênc. Agrotec. v. 28, n. 3, p. 614-634, 2004. Available from: < [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413-70542004000300018](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542004000300018) >. Accessed: 15 Ago. 2019. doi: 10.1590/S1413-70542004000300018.

CHAKRABORTY, A. et al. Novel combination of selective agents for isolation of Leptospira species, **Microbiology and Immunology**, v. 55, n. 7, p. 494–501, 2011. Available from: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1348-0421.2011.00347.x> >. Accessed: 31 Nov. 2019. doi: 10.1111/j.1348-0421.2011.00347.x.

COELHO, M. C. S. C. et al. Aspectos sanitários de rebanhos caprinos e ovinos em assentamentos no município de Petrolina-PE. **Revista Semiárido de Visu**, Petrolina,

v.1, n. 1, p.32-40, 2011. Available from: < <https://periodicos.ifsertao-pe.edu.br/ojs2/index.php/semiaridodevisu/article/view/26> >. Accessed: 18 Abr. 2019.

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. Available from: < <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/20974> >. Accessed: 07 Dez. 2019. doi: 10.5433/1679-0359.2016v37n2p819.

COSTA, D.F. et al. Leptospirosis in native mixed-breed sheep slaughtered a semiarid region of Brazil. **Cienc. Rural**. v. 47, 2017. Available from: < [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782017000200451](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782017000200451) >. Accessed: 27 Out. 2019. doi: 10.1590/0103-8478cr20160563.

DIRECTOR, A. et al. Isolation of *Leptospira interrogans* Hardjoprajitno from vaginal fluid of a clinically healthy ewe suggests potential for venereal transmission, **Journal of Medical Microbiology**, v. 63, n. 9, p. 1234–1236, 2014a. Available from: < <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.065466-0> >. Accessed: 14 Ago. 2019. doi: 10.1099/jmm.0.065466-0.

DIRECTOR, A. et al. Molecular detection of leptospiral carriers in sheep under tropical field conditions, **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 51, n. 3, p. 220–223, 2014b. Available from: < <http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/80967> >. Accessed: 13 Abr. 2020. doi: 10.11606/issn.1678-4456.v51i3p220-223.

ELLIS, W. A. Animal leptospirosis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, Tokyo, v. 387, n. 1, p. 99-137, 2015. Available from: < [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-45059-8\\_6](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-45059-8_6) >. Accessed: 10 Mai. 2020. doi: 10.1007/978-3-662-45059-8\_6.

FAINE, S. et al. **Leptospira and Leptospirosis**. 2<sup>th</sup> ed. Melbourne: MediSci Press, 1999. 272 p.

FERNANDES, C. E. **Papel do ovino na cadeia epidemiológica da leptospirose pela *Leptospira* spp. sorovar Hardjo: fatores de risco que envolvem a infecção e transmissão entre ovinos e bovinos**. 2009. 101p. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) - Instituto Biológico, São Paulo, SP, 2009.

FREITAS, J.C. et al. Isolamento de *Leptospira* spp. de cães, bovinos e suínos naturalmente infectados. **Ciência Rural**, v.34, n.3, p.853-856, 2004. Available from: < [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-)

[84782004000300030&lng=en&tlng=en](https://doi.org/10.1590/S0103-84782004000300030) >. Accessed: 21 Fev. 2020. doi: 10.1590/S0103-84782004000300030.

GAMAGE, C.D. et al. Prevalence and carrier status of leptospirosis in smallholder dairy cattle and peridomestic rodents in Kandy, Sri Lanka. **Vector-Borne Zoonotic Dis**, v. 11, p. 1041–1047, 2011. Available from: < <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/vbz.2010.0153> >. Accessed: 17 Dez. 2019. doi: 10.1089/vbz.2010.0153.

GIRARDI G. & ROSA J.V. **Atlas geográfico do estudante**. Editora FDT S. A., São Paulo. 160p. 2011.

GOUY, M. et al. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building, *Molecular Biology and Evolution*, v. 27, n. 2, p. 221–224, 2010. Available from: < <https://academic.oup.com/mbe/article/27/2/221/970247> >. Accessed: 07 Mar. 2020. doi: 10.1093/molbev/msp259.

HAMOND, C. et al. Urinary PCR as an increasingly useful tool for an accurate diagnosis of leptospirosis in livestock, *Veterinary Research Communications*, v. 38, n. 1, p. 81–86, 2014. Available from: < <https://link.springer.com/article/10.1007/s11259-013-9582-x> >. Accessed: 09 Jun. 2020. doi: 10.1007/s11259-013-9582-x.

HIGINO, S S.S. et al. Frequência de leptospirose em ovinos abatidos no Município de Patos, Paraíba. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, n.3, p.525-527, 2010. Available from: < [http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/arq/v77\\_3/higino.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/arq/v77_3/higino.pdf) >. Accessed: 16 Ago. 2019.

HIGINO S.S.S.; AZEVEDO S.S. Leptospirose em pequenos ruminantes: situação epidemiológica atual no Brasil. **Arq. Inst. Biol.** V. 81, n. 1, p. 86-94, 2014. Available from: < <http://www.scielo.br/pdf/aib/v81n1/1808-1657-aib-81-01-00086.pdf> >. Accessed: 23 Jan. 2019. doi: 10.1590/S1808-16572014000100017.

IBGE. **Censo Agropecuário 2019: Resultados definitivos. Rio de Janeiro, IBGE. 2019**. Available from: < [https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo\\_agro/resultadosagro/pecuaria.html?localidade=0&tema=75674](https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo_agro/resultadosagro/pecuaria.html?localidade=0&tema=75674) > Acesso em: 16 jan. 2020.

LILENBAUM, W. et al. Identification of *Leptospira* spp. carriers among seroreactive goats and sheep by polymerase chain reaction. **Research in Veterinary Science**, v.87, p.16-19, 2009. Available from: <

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0034528808002804> >.

Accessed: 03 Jul. 2019. doi: 10.1016/j.rvsc.2008.12.014.

MARTINS G. et al. Leptospirosis as the most frequent infectious disease impairing productivity in small ruminants in Rio de Janeiro, **Brazil. Trop. Anim. Health Prod.** v. 44, n. 4, p. 773-777. 2012. Available from: <

<https://link.springer.com/article/10.1007/s11250-011-9964-4> >. Accessed: 22 Jun.

2019. doi: 10.1007/s11250-011-9964-4.

MARTINS, G.; LILENBAUM, W. Leptospirosis in sheep and goats under tropical conditions, **Tropical Animal Health and Production**, v. 46, n. 1, p. 11–17, 2014.

Available from: < <https://link.springer.com/article/10.1007/s11250-013-0480-6> >.

Accessed: 14 Nov. 2019. doi: 10.1007/s11250-013-0480-6.

NÓBREGA JÚNIOR, J.E. et al. Mortalidade perinatal de cordeiros no semi-árido da Mortalidade perinatal de cordeiros no semi-árido da Paraíba Paraíba. **Pesq. Vet. Bras.** v. 25, n. 3, p. 171-178, abr./jun. 2005. Available from: <

[https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-](https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-736X2005000300008&script=sci_abstract&tlng=pt)

[736X2005000300008&script=sci\\_abstract&tlng=pt](https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-736X2005000300008&script=sci_abstract&tlng=pt) >. Accessed: 21 Out. 2019. doi:

10.1590/S0100-736X2005000300008.

NOGUEIRA, D. B. et al. Use of serological and molecular techniques for detection of *Leptospira* sp. carrier sheep under semiarid conditions and the importance of genital transmission route. **Acta Tropica**, 2020. Available from: <

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X20303818> >. Accessed:

Jun. 01, 2020. doi: 10.1016/j.actatropica.2020.105497.

OIE. Leptospirosis: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals.

**World Organization for Animal Health**, Paris, 2014. Available from: <

<https://www.oie.int/standard-setting/terrestrial-manual/> >. Accessed: Nov. 04, 2020.

OTAKA, D.Y. et al. Serology and PCR for bovine leptospirosis: herd and individual approaches. **Vet. Rec.** v.170, p. 338, 2012. Available from: <

<https://veterinaryrecord.bmj.com/content/170/13/338.2> >. Accessed: Ago. 02, 2019. doi:

10.1136/vr.100490.

PICARDEAU, M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. **Médecine et Maladies Infectieuses**, Paris, n. 43, n. 1, p. 1-9, 2013. Available from: <

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0399077X12003198?via%3DiHub>

[b](https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0399077X12003198?via%3DiHub) >. Accessed: Abr. 03, 2020. doi: 10.1016/j.medmal.2012.

PLATT, A.R. et al. Improved DNA sequencing quality and efficiency using an optimized fast cycle sequencing protocol, **Biotechniques**, v. 43, n. 1, p. 58–62, 2007. Available from: < <https://www.future-science.com/doi/10.2144/000112499> >. Accessed: Abr. 31, 2020. doi: 10.2144/000112499.

RIZZO, H. et al. Análise de fator de risco e avaliação clínica de ovinos com histórico de distúrbios reprodutivos infectados por leptospiros pertencentes à criatórios do estado de São Paulo. **Veterinária e Zootecnia**, v.18, n.4, 2011. Available from: < <http://www.fmvz.unesp.br/rvz/index.php/rvz/article/view/440> >. Accessed: Jul. 22, 2020.

SANTOS, F. A. dos. et al. Inquérito soro-epidemiológico, isolamento e fatores de risco associado à infecção por brucella ovis em ovinos deslanados do semi-árido da paraíba, Patos, PB, 2008. In: VI CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE, 2009, Campina Grande, PB, **Anais...** Campina Grande: Pró-reitoria de Pós-graduação, 2009.

SILVA, M. V. D.; SILVA, E. D. F. Possíveis causas de aborto em caprinos. Comunicado técnico. **EMBRAPA – Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos**, v.12, p.1-9, 1983. Available from: < <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/514903> >. Accessed: Fev. 02, 2020.

SILVA, E.F. et al. Isolation of *Leptospira* Noguchii from sheep. **Veterinary Microbiology**, v.121, p.144-149, 2007. Available from: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113506004652?via%3Dihub> >. Accessed: Jan. 13, 2020. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.11.010.

SILVA A.F. et al. High frequency of genital carriers of *Leptospira* sp. in sheep slaughtered in the semi-arid region of northeastern Brazil. **Trop Anim Health Prod.** v. 51, p. 43, 2018. Available from: < <https://link.springer.com/article/10.1007/s11250-018-1657-9> >. Accessed: Mai. 18, 2020. doi: 10.1007/s11250-018-1657-9.

SOUSA, W. H. O Agronegócio da caprinocultura de corte no Brasil. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 1, n. 1, p. 51-58, 2007. Available from: < <http://sheepembryo.com.br/files/pdf/436.pdf> >. Accessed: Ago. 28, 2019.

STODDARD, R.A. et al. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene, **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 64, n. 3, p. 247–255, 2009. Available from: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0732889309001059?via%3Dihub> >. Accessed: Out. 09, 2019. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2009.03.014.



VANASCO, N. B. et al. Clinical characteristics and risk factors of human leptospirosis in Argentina (1999-2005). **Acta Tropica**, Amsterdã, v. 107, p. 255-258, 2008.  
Available from: <  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0001706X08001812?via%3Dihub>>. Accessed: Mai. 10, 2019. doi: 10.1016/j.actatropica.2008.06.007.

#### DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflitos de interesse. Os patrocinadores fundadores não tiveram nenhum papel no desenho do estudo; na coleta, análise ou interpretação dos dados; na redação do manuscrito; ou na decisão de publicar os resultados.

#### CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

Os autores contribuíram igualmente para o manuscrito.

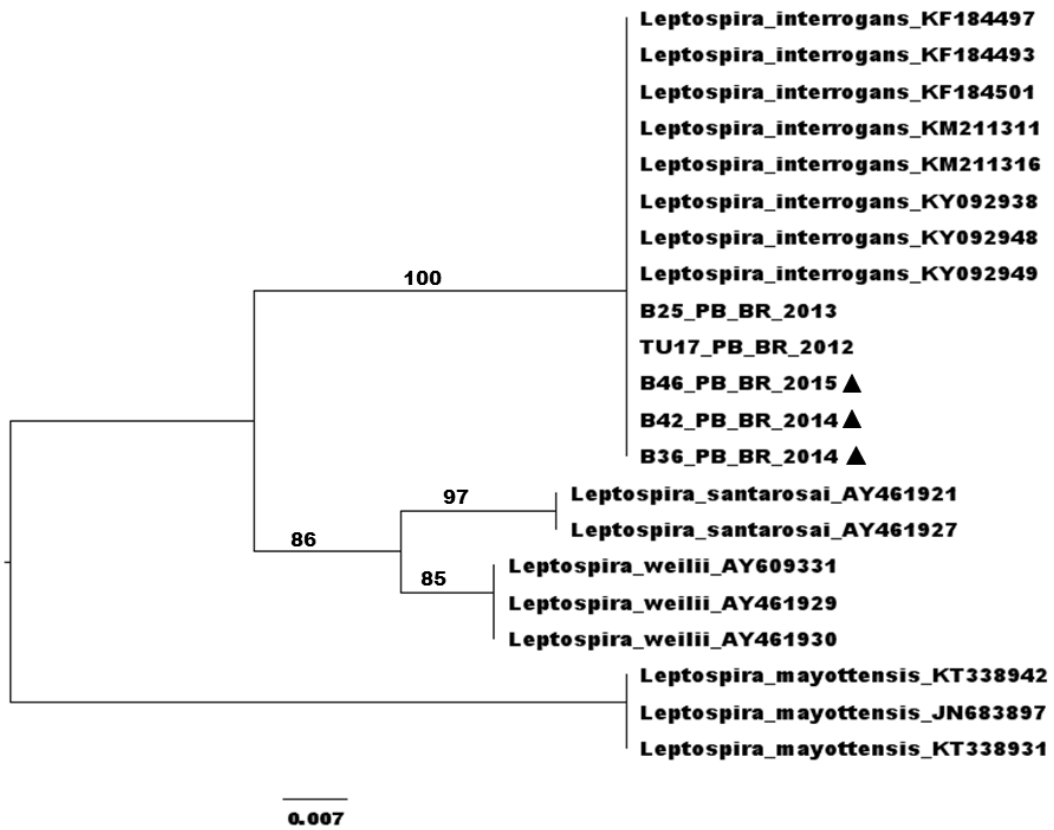


Figure 1. A árvore filogenética construída pelo método Neighbor-Joining e modelo Jukes-Cantor, bootstrap com 1000 repetições. ▲ Amostras sequenciadas

Identificação Animal	SAM		PCR Órgãos		Cultura	
	100	200	Rim	Bexiga	Rim	Bexiga
1	-	-	-	+	+	+
2	-	-	-	-	+	-
3	-	-	-	-	-	-
4	-	-	+	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	+	-	-	-
7	-	-	-	-	-	+
8	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	+	-	-
12	-	-	+	+	-	-
13	-	-	-	+	-	-
14	-	-	-	+	-	-
15	-	-	-	+	-	-
16	-	-	+	-	-	-
17	-	-	-	+	-	-
18	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	+	-	-
20	-	-	-	+	-	-
21	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	+	-	-
Total	0	0	4	10	2	2

Tabela 1: Resultados obtidos de *Leptospira* sp. utilizando diferentes técnicas diagnosticas (MAT, PCR e Cultura de *Leptospira* sp.) em ovinos criados em condições de ambiente semiárido.

## NORMAS DA REVISTA

### ESCOPO:

**1. CIÊNCIA RURAL** - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas referentes à área de Ciências Agrárias, que deverão ser destinados com exclusividade.

**2.** Os **artigos científicos, revisões e notas** devem ser encaminhados via eletrônica e editados **preferencialmente em idioma Inglês**. Os encaminhados em Português poderão ser traduzidos após a 1ª rodada de avaliação para que ainda sejam revisados pelos consultores ad hoc e editor associado em rodada subsequente. Entretanto, caso **não traduzidos** nesta etapa e se **aprovados** para publicação, terão que ser **obrigatoriamente traduzidos para o Inglês** por empresas credenciadas pela Ciência Rural e obrigatoriamente terão que apresentar o certificado de tradução pelas mesmas para seguir tramitação na CR.

### Empresas credenciadas:

- American Journal Experts (<http://www.journalexperts.com/>)
- Bioedit Scientific Editing (<http://www.bioedit.co.uk/>)
- BioMed Proofreading (<http://www.biomedproofreading.com>)
- Edanz (<http://www.edanzediting.com>)
- Editage (<http://www.editage.com.br/>) 10% discount for CR clients. Please inform Crural10 code.
- Enago (<http://www.enago.com.br/forjournal/>) Please inform CIRURAL for special rates.
- GlobalEdico (<http://www.globaledico.com/>)
- JournalPrep (<http://www.journalprep.com>)
- Liberty Medical Communications (<http://libertymedcom.com/>)
- Proof-Reading-Service.com (<http://www.proof-reading-service.com/pt/>)
- Readytopub (<https://www.readytopub.com/home>)

### LIMITE DE PÁGINAS:

Todas as linhas deverão ser numeradas e paginadas no lado inferior direito. O trabalho deverá ser digitado em tamanho A4 210 x 297mm com, no máximo, 25 linhas por

página em espaço duplo, com margens superior, inferior, esquerda e direita em 2,5cm, fonte Times New Roman e tamanho 12. O máximo de páginas será **15 para artigo científico, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e figuras**. Figuras, gráficos e tabelas devem ser disponibilizados ao final do texto e individualmente por página, sendo que não poderão ultrapassar as margens e **nem estar com apresentação paisagem**.

**Tendo em vista o formato de publicação eletrônica estaremos considerando manuscritos com páginas adicionais** além dos limites acima. No entanto, os trabalhos aprovados que possuírem páginas **excedentes** terão um custo adicional para a publicação ([vide taxa](#)).

#### **ESTRUTURA:**

**3. O artigo científico** (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados e Discussão ou resultados/discussão (juntos); Conclusão; Referências e Declaração de conflito de interesses. Agradecimento(s) e Apresentação; Contribuição dos autores; Fontes de Aquisição; Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente, pode ser enviado um dos modelos ao lado ([Declaração Modelo Humano](#), [Declaração Modelo Animal](#)).

**4. A revisão bibliográfica** (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; Referências e Declaração de conflito de interesses. Agradecimento(s) e Apresentação; Contribuição dos autores; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado ([Declaração Modelo Humano](#), [Declaração Modelo Animal](#)).

**5. A nota** (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Texto (sem subdivisão, porém com Introdução; Metodologia; Resultados e Discussão e Conclusão; podendo conter tabelas ou figuras); Referências e Declaração de conflito de interesses. Agradecimento(s) e Apresentação; Contribuição dos autores; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado ([Declaração Modelo Humano](#), [Declaração Modelo Animal](#)).

#### **COVER LETTER:**

**6.** O preenchimento do campo "**cover letter**" deve apresentar, obrigatoriamente, as seguintes informações em inglês, **exceto** para artigos **submetidos em português** (lembrando que preferencialmente os artigos devem ser submetidos em inglês).

- a) What is the major scientific accomplishment of your study?
- b) The question your research answers?
- c) Your major experimental results and overall findings?
- d) The most important conclusions that can be drawn from your research?
- e) Any other details that will encourage the editor to send your manuscript for review?

Para maiores informações acesse o seguinte [tutorial](#).

**7.** Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no formato pdf no endereço eletrônico da revista [www.scielo.br/cr](http://www.scielo.br/cr).

#### **TÍTULOS:**

**8.** Descrever o título em português e inglês (caso o artigo seja em português) - inglês e português (caso o artigo seja em inglês). Somente a primeira letra do título do artigo deve ser maiúscula exceto no caso de nomes próprios. Evitar abreviaturas e nomes científicos no título. O nome científico só deve ser empregado quando estritamente necessário. Esses devem aparecer nas palavras-chave, resumo e demais seções quando necessários.

9. As citações dos autores, no texto, deverão ser feitas com letras maiúsculas seguidas do ano de publicação, conforme exemplos: Esses resultados estão de acordo com os reportados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996), como uma má formação congênita (MOULTON, 1978).

10. Nesse [link](#) é disponibilizado o **arquivo de estilo** para uso com o software **EndNote** (o EndNote é um software de gerenciamento de referências, usado para gerenciar bibliografias ao escrever ensaios e artigos). Também é disponibilizado nesse [link](#) o **arquivo de estilo** para uso com o software **Mendeley**.

## **REFERÊNCIAS:**

11. As Referências deverão ser efetuadas no estilo ABNT (NBR 6023/2000) conforme normas próprias da revista.

### **11.1. Citação de livro:**

JENNINGS, P.B. **The practice of large animal surgery**. Philadelphia : Saunders, 1985. 2v.

TOKARNIA, C.H. et al. (Mais de dois autores) **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. Manaus : INPA, 1979. 95p.

### **11.2. Capítulo de livro com autoria:**

GORBAMAN, A. A comparative pathology of thyroid. In: HAZARD, J.B.; SMITH, D.E. **The thyroid**. Baltimore : Williams & Wilkins, 1964. Cap.2, p.32-48.

### **11.3. Capítulo de livro sem autoria:**

COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In: \_\_\_\_\_. **Sampling techniques**. 3.ed. New York : John Willey, 1977. Cap.4, p.72-90.

TURNER, A.S.; McILWRAITH, C.W. Fluidoterapia. In: \_\_\_\_\_. **Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte**. São Paulo : Roca, 1985. p.29-40.

### **11.4. Artigo completo:**

O autor deverá acrescentar a url para o artigo referenciado e o número de identificação DOI (Digital Object Identifiers), conforme exemplos abaixo:

MEWIS, I.; ULRICHS, CH. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Product Research**, Amsterdam (Cidade opcional), v.37, p.153-164, 2001. Available from: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X\(00\)00016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3)>. Accessed: Mar. 18, 2002. doi: 10.1016/S0022-474X(00)00016-3.

PINTO JUNIOR, A.R. et al (Mais de 2 autores). Response of *Sitophilus oryzae* (L.), *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) and *Oryzaephilus surinamensis* (L.) to different concentrations of diatomaceous earth in bulk stored wheat. **Ciência Rural**, Santa Maria (Cidade opcional), v. 38, n. 8, p.2103-2108, nov. 2008. Available from: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso)>. Accessed: Mar. 18, 2009. doi: 10.1590/S0103-84782008000800002.

SENA, D. A. et al. Vigor tests to evaluate the physiological quality of corn seeds cv. 'Sertanejo'. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 47, n. 3, e20150705, 2017. Available from: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782017000300151&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782017000300151&lng=pt&nrm=iso)>. Accessed: Mar. 18, 2017. Epub 15-Dez-2016. doi: 10.1590/0103-8478cr20150705 (Artigo publicado eletronicamente).

#### 11.5. Resumos:

RIZZARDI, M.A.; MILGIORANÇA, M.E. Avaliação de cultivares do ensaio nacional de girassol, Passo Fundo, RS, 1991/92. In: JORNADA DE PESQUISA DA UFSM, 1., 1992, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria : Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 1992. V.1. 420p. p.236. (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

#### 11.6. Tese, dissertação:

COSTA, J.M.B. **Estudo comparativo de algumas características digestivas entre bovinos (Charolês) e bubalinos (Jafarabad)**. 1986. 132f.

Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/ Mestrado/Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria. (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).



### 11.7. Boletim:

ROGIK, F.A. **Indústria da lactose**. São Paulo : Departamento de Produção Animal, 1942. 20p. (Boletim Técnico, 20). (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

### 11.8. Informação verbal:

Identificada no próprio texto logo após a informação, através da expressão entre parênteses. Exemplo: ... são achados descritos por Vieira (1991 - Informe verbal). Ao final do texto, antes das Referências Bibliográficas, citar o endereço completo do autor (incluir E-mail), e/ou local, evento, data e tipo de apresentação na qual foi emitida a informação.

### 11.9. Documentos eletrônicos:

MATERA, J.M. **Afecções cirúrgicas da coluna vertebral: análise sobre as possibilidades do tratamento cirúrgico**. São Paulo : Departamento de Cirurgia, FMVZ-USP, 1997. 1 CD. (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

GRIFON, D.M. Arthroscopic diagnosis of elbow displasia. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS, 31., 2006, Prague, Czech Republic. **Proceedings...** Prague: WSAVA, 2006. p.630-636. Online. Available from: <<http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture22/Griffon1.pdf?LA=1>>. Accessed: Mar. 18, 2005 (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

UFRGS. **Transgênicos**. Zero Hora Digital, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais. Online. Available from: <<http://www.zh.com.br/especial/index.htm>>. Accessed: Mar. 18, 2001(OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen. **Maturitas**, (Ireland), v.34, n.2, p.179-184, Feb 15, 2000. Obtido via base de dados MEDLINE. 1994-2000. Online. Available from: <<http://www.Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm>>. Accessed: Mar. 18, 2007.

MARCHIONATTI, A.; PIPPI, N.L. Análise comparativa entre duas técnicas de recuperação de úlcera de córnea não infectada em nível de estroma médio. In: SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CIRURGIA VETERINÁRIA, 3., 1997, Corrientes, Argentina. **Anais...** Corrientes : Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE,

1997. Disquete. 1 disquete de 31/2. Para uso em PC. (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

## **DESENHOS, GRÁFICOS E FOTOGRAFIAS:**

12. Desenhos, gráficos e fotografias serão denominados figuras e terão o número de ordem em algarismos arábicos. A revista não usa a denominação quadro. As figuras devem ser disponibilizadas individualmente por página. Os desenhos, as figuras e os gráficos (com largura de no máximo 16cm) devem ser feitos em editor gráfico sempre em qualidade máxima com pelo menos 300 dpi em extensão .tiff. As tabelas devem conter a palavra tabela, seguida do número de ordem em algarismo arábico e não devem exceder uma lauda.

13. Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).

14. Será obrigatório o cadastro de todos autores nos metadados de submissão. O artigo não tramitará enquanto o referido item não for atendido. Excepcionalmente, mediante consulta prévia para a Comissão Editorial outro expediente poderá ser utilizado.

15. Lista de verificação (Checklist [.doc](#), [.pdf](#)).

16. Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.

17. Os artigos não aprovados serão arquivados havendo, no entanto, o encaminhamento de uma justificativa pelo indeferimento.

18. Em caso de dúvida, consultar artigos de fascículos já publicados antes de dirigir-se à Comissão Editorial.

19. Todos os artigos encaminhados devem pagar a [taxa de tramitação](#). Artigos reencaminhados (**com decisão de Reject and Resubmit**) deverão pagar a taxa de tramitação novamente. Artigos arquivados por **decorso de prazo** não terão a taxa de tramitação reembolsada.

20. Todos os artigos submetidos passarão por um processo de verificação de plágio usando o programa “Cross Check”.

## **CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES:**

21. **Contribuição dos autores**

Para se qualificar para a autoria do manuscrito submetido, todos os autores listados

deveriam ter contribuições intelectuais substanciais tanto para a pesquisa quanto para sua preparação. Por favor, use um dos exemplos abaixo ou faça o seu.

**Exemplo**

**um**

RW, RA e RCNO conceberam e projetaram experimentos. WC, LM e AA realizaram os experimentos, BB realizou as análises laboratoriais. BB supervisionou e coordenou os experimentos com animais e forneceu dados clínicos. BB realizou análises estatísticas de dados experimentais. WC, MB e NO prepararam o rascunho do manuscrito. Todos os autores revisaram criticamente o manuscrito e aprovaram a versão final.

**Exemplo**

**dois**

Todos os autores contribuíram igualmente para a concepção e redação do manuscrito. Todos os autores revisaram criticamente o manuscrito e aprovaram a versão final.

**Exemplo**

**três**

Os autores contribuíram igualmente para o manuscrito

**ORCID:**

**22. O ORCID** (Open Research and Contributors Identification) permite a criação de identificadores digitais únicos (ORCID ID) para pesquisadores, facilitando a identificação nacional e internacional do pesquisador e sua produção. Dessa forma **recomendamos** que todos os autores de cada submissão adotem o registro **ORCiD** em suas publicações.

## **CONCLUSÃO GERAL**

Os achados nesta pesquisa comprovam a importância do trato urinário como sítio de colonização das leptospiros nas espécies caprinas e ovinas, dando ênfase a bexiga, que é pouco evidenciada em estudos anteriores, demonstrando o risco da transmissão urinária nos rebanhos de pequenos ruminantes. Também foi exposto a alta prevalência nesses rebanhos com o método PCR, salientando a importância de utilizar a MAT e PCR associadas para resultados fidedignos, ajudando nas medidas de controle e profilaxia da leptospirose em rebanhos de caprinos e ovinos do semiárido brasileiro, aos quais os animais apresentam elevada rusticidade.