

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

Frequência de anticorpos e tentativa de isolamento de *Leptospira* spp. a partir do trato geniturinário de cabras (*Capra hircus*) abatidas no Matadouro Público Municipal de Patos - PB

Pedro Jorge Álvares de Faria

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

Frequência de anticorpos e tentativa de isolamento de *Leptospira* spp. a partir do trato geniturinário de cabras (*Capra hircus*) abatidas no Matadouro Público Municipal de Patos - PB

Pedro Jorge Álvares de Faria
Graduando

Prof. Titular Clebert José Alves
Orientador

Patos-PB
Agosto de 2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSRT DA UFCG

F224f Faria, Pedro Jorge Álvares de
Frequência de anticorpos e tentativa de isolamento de *Leptospira* spp. a partir do trato geniturinário de cabras (*Capra hircus*) abatidas no Matadouro Público Municipal de Patos - PB / Pedro Jorge Álvares de Farias. – Patos, 2017.
40f.
Trabalho de Conclusão de Curso (Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2017.
“Orientação: Prof. Dr. Clebert José Alves.”
Referências.
1. Leptospirose. 2. Caprino. 3. Sorologia. 4. Isolamento. I. Título.

CDU636.39

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE

CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

PEDRO JORGE ÁLVARES DE FARIA
Graduando

Monografia submetida ao Curso de Medicina Veterinária como requisito parcial para obtenção do grau de Médico Veterinário.

APROVADA EM/...../.....

MÉDIA: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Titular Clebert José Alves
Orientador

Nota: _____

Prof. Dr. Severino Silvano dos Santos Higinio
Examinador I

Nota: _____

MSc. Diego Figueiredo da Costa
Examinador II

Nota: _____

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

PEDRO JORGE ÁLVARES DE FARIA
Graduando

Monografia submetida ao Curso de Medicina Veterinária como requisito parcial para obtenção do grau de Médico Veterinário.

APROVADO EM/...../.....

EXAMINADORES:

Prof. Titular Clebert José Alves

Prof. Dr. Severino Silvano dos Santos Higino

MSc. Diego Figueiredo da Costa

Aos meus pais, Maria Núbia e Edson, por sempre tratar como prioridade a ótima educação oferecida a minha irmã e a mim, fazendo-nos saber que esta é a mais valiosa herança que alguém pode receber.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por não me deixar fraquejar e indicar-me quais os melhores caminhos.

Aos meus avós paternos, Júlio (“*in memoriam*”) e Alzira (“*in memoriam*”), foram essenciais durante a minha infância na Fazenda Arapuá; e maternos, Nilo e Severina, pela imensurável colaboração na minha formação como pessoa, e também por todo o aconchego oferecido na Fazenda Campos, reforçando os meus laços com os animais e o meio rural.

A minha única irmã, Maria Eugênia, pelo companheirismo ao longo desses anos.

A Giulia Ricaldi, minha namorada e colega de curso, não existem palavras para expressar a gratidão diante das suas atitudes ao longo da nossa convivência.

Ao Dr. Jaime Miguel Araújo Filho, pela grande amizade e por me servir de inspiração como profissional e pessoa.

Ao Prof. Titular Clebert José Alves, na condição de orientador, por servir de exemplo com a sua inquestionável postura profissional, sempre presente.

Ao Prof. Dr. Severino Silvano dos Santos Higino, constantemente acessível e pronto para ajudar.

Ao Prof. Dr. Sérgio Santos de Azevedo, pela orientação no PROCAD, sendo a minha primeira oportunidade na área da medicina veterinária preventiva.

Aos hoje médicos veterinários Raphael Silva Neto e Heitor Cabral, com quem dividi morada em Patos, cada um com suas particularidades, por sempre me servirem de exemplos ao longo do curso.

Aos amigos que formam o Grupo de Estudo Bico do Urubu, André Phellipe, Arthur Gomes, Charles Santos, Chiarelli Leandro, Ermano Oliveira, João Augusto, João Paulo, Juninho Cirino e Ruhan Henrique.

A todos os amigos que ajudaram na execução da pesquisa, Diego Costa, Aline Silva, Giulia Ricaldi, Denise Nogueira, Renato Vaz, Juciê Fernandes, Camila Bezerra e Davidianne Morais.

A querida Dona Francinete pela dedicação aos serviços no laboratório.

Ao Grupo de Pesquisa em Doenças Transmissíveis, por todo o conhecimento oferecido.

Aos funcionários da Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, Fernanda e João Batista, pela competência com que executam as suas funções e pelo bom relacionamento com os alunos da medicina veterinária.

A toda a turma 2012.2, por todos os momentos compartilhados.

A todos os integrantes do Grupo de Estudos em Buiatria – GEBU/UFMG, por todo o conhecimento compartilhado e ensinamentos sobre trabalho em equipe.

SUMÁRIO

| | Pág. |
|--|-----------|
| LISTA DE FIGURAS | |
| LISTA DE QUADROS | |
| LISTA DE TABELAS | |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 14 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA..... | 16 |
| 2.1 Agente Etiológico..... | 16 |
| 2.2 Aspectos Epidemiológicos..... | 17 |
| 2.3 Patogenia..... | 17 |
| 2.4 Sinais Clínicos..... | 18 |
| 2.5 Patologia..... | 18 |
| 2.6 Diagnóstico..... | 19 |
| 2.6.1 Clínico..... | 19 |
| 2.6.2 Sorológico..... | 19 |
| 2.6.3 Exame direto em microscopia de campo escuro..... | 20 |
| 2.6.4 Inoculação em animais de laboratório..... | 21 |
| 2.6.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) | 21 |
| 2.6.6 Imunofluorescência..... | 22 |
| 2.6.7 Isolamento do agente..... | 23 |
| 2.6.8 Imuno-histoquímica (IHC)..... | 23 |
| 2.7 Controle e Profilaxia..... | 24 |
| 2.8 Tratamento..... | 25 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 26 |
| 3.1 | Local do Estudo..... | 26 |
| 3.2 | Número de Animais..... | 26 |
| 3.3 | Tentativa de Isolamento..... | 26 |
| 3.4 | Soros Sanguíneos..... | 27 |
| 3.5 | Leituras..... | 27 |
| 3.5.1 | Macroscópica..... | 27 |
| 3.5.2 | Microscópica..... | 27 |
| 3.6 | Técnica da Soroaglutinação Microscópica (SAM) | 28 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 30 |
| 5 | CONCLUSÃO..... | 35 |
| | REFERÊNCIAS..... | 36 |

LISTA DE FIGURAS

| | Pág. |
|--|------|
| Figura 1 - Reações de imunofluorescência positiva e negativa..... | 22 |
| Figura 2 - Amostra negativa e positiva na SAM, respectivamente..... | 29 |
| Figura 3 - Turvação macroscópica da cultura de rim da cabra 34..... | 31 |

LISTA DE QUADROS

| | Pág. |
|--|------|
| Quadro 01 - Coleção de cepas patogênicas cedidas pelo Laboratório de Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal Fluminense (UFF), oriundas do Instituto Pasteur, França..... | 28 |

LISTA DE TABELAS

| | Pág. |
|---|------|
| Tabela 01 Resultado da tentativa de isolamento de <i>Leptospira</i> spp. e da Soroaglutinação Microscópica (SAM) realizadas a partir de amostras de cabras abatidas no Matadouro Público Municipal de Patos-PB entre fevereiro e novembro de 2016..... | 30 |

RESUMO

FARIA, PEDRO JORGE ÁLVARES. Frequência de anticorpos e tentativa de isolamento de *Leptospira* spp. a partir do trato geniturinário de cabras (*Capra hircus*) abatidas no Matadouro Público Municipal de Patos – PB, Patos, UFCG. 2017 40p. (Monografia – Curso de Medicina Veterinária, Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal).

A leptospirose se trata de uma zoonose amplamente difundida no mundo, sendo um problema de saúde animal e pública. Nos animais tem como maiores impactos as causas relacionadas com o desempenho reprodutivo dos rebanhos acometidos. Com o presente estudo objetivou-se determinar a frequência de anticorpos e isolar *Leptospira* spp. a partir de amostras do trato geniturinário de cabras abatidas no Matadouro Público Municipal de Patos – PB. Foram amostradas 53 cabras, das quais foram coletados sangue, rim, bexiga, urina e fluido vaginal. Para detecção de anticorpos a prova de Soroaglutinação Microscópica (SAM) foi utilizada. A tentativa de isolamento foi realizada a partir de urina e tecidos do trato geniturinário, utilizando-se meios de cultivo próprios. Foi encontrada uma frequência de anticorpos de 13,61% (7/53). Os anticorpos encontrados foram para os sorogrupos Icterohaemorrhagiae (42,85%), Autumnalis (28,57%) e Tarassovi (28,57%), com títulos de 100 (71,43% - 5/7) ou 200 (28,57% - 2/7). Obtiveram-se 6 culturas com presença de microrganismos com morfologias semelhantes à *Leptospira* spp. Diante do exposto, é possível que a baixa frequência e os baixos títulos encontrados se devam as condições adversas oferecidas ao agente pelo ambiente, bem como a própria resistência dos caprinos a infecção, fazendo com que haja uma menor resposta humoral nesses animais. Portanto, em condições de clima semiárido, um ponto de corte mais baixo na prova sorológica deve ser considerado para espécie em questão. Estudos pontuais que busquem o isolamento e tipificação de cepas circulantes em nossa região são necessários para a construção e aplicação de estratégias de profilaxia e controle desta doença.

Palavras-chave: Leptospirose, caprinos, sorologia, isolamento.

ABSTRACT

FARIA, PEDRO JORGE ÁLVARES. Frequency of antibodies and attempt to isolate *Leptospira* spp. From the genitourinary tract of goats (*Capra hircus*) slaughtered in the Public Slaughterhouse of Patos - PB. Patos, UFCG. 2017 40p. (Monograph- Veterinary Medicine, Preventive Veterinary Medicine and Animal Health).

Leptospirosis is a widespread zoonosis in the world, being an animal and public health problem. In animals, the causes related to the reproductive performance of the affected herds have the greatest impact. The present study aimed to determine the frequency of antibodies and to isolate *Leptospira* spp from samples of the genitourinary tract of slaughtered goats in the Public Slaughterhouse of Patos - PB. 53 goats were sampled, from which blood, kidney, bladder, urine and vaginal fluid were collected. For the detection of antibodies the Microscopic Soroagglutination (SAM) test was used. The attempt of isolation was made from urine and tissues of the genitourinary tract, using own culture media. An antibody frequency of 13.61% (7/53) was found. Antibodies were found for the serogroups Icterohaemorrhagiae (42.85%), Autumnalis (28.57%) and Tarassovi (28.57%), with titers of 100 (71.43% - 5/7) or 200 (28, 57% - 2/7). Six cultures were obtained with microorganisms with similar morphologies to *Leptospira* spp. In view of the above, it is possible that the low frequency and the low titres found are due to the adverse conditions offered to the agent by the environment, as well as the resistance of the goats to the infection, resulting in a lower humoral response in these animals. Therefore, in semi-arid climate conditions, a lower cut-off point in the serological test should be considered for the species in question. One-off studies that seek the isolation and typing of circulating strains in our region are necessary for the construction and application of prophylaxis and control strategies for this disease.

Keywords: Leptospirosis, goats, serology, isolation.

1 INTRODUÇÃO

A caprinovinocultura é uma atividade econômica de grande valor para a pecuária brasileira e principalmente para a região Nordeste, sendo fundamental para a fixação do homem ao campo, a criação de caprinos tem importante função na geração de renda e subsistência dos pequenos agricultores familiares, consistindo em uma valiosa função socioeconômica. O Brasil é contemplado com uma grande extensão territorial, possuindo várias condições favoráveis para a criação desses animais. O seu rebanho está entre os dez maiores do mundo, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2014) a quantidade é de aproximadamente 8.851.879 de caprinos e 17.614.454 de ovinos, a maioria deste efetivo se encontra no Nordeste, representando 91,6% e 57,5% do rebanho caprino e ovino nacional, respectivamente.

Nos últimos anos a caprinovinocultura vem despertando o interesse dos governantes, técnicos e produtores, deixando de ser vista como uma prática de subsistência e passando a ser visto o seu potencial socioeconômico, ganhando espaço no contexto científico voltado para saúde e produção animal, impulsionando a prática da atividade. Entretanto, esse interesse ainda parece ser insuficiente, visto que os índices produtivos ainda são considerados baixos quando comparados com os de outras regiões.

O manejo dos rebanhos é praticado muitas vezes de forma rudimentar, extremamente dependente das condições ambientais, com reduzida participação de assistência técnica, deficiente gestão produtiva, mas sobretudo, carece de controle sanitário efetivo. Apesar disto, o mercado consumidor passa a exigir uma maior preocupação sanitária através de condutas de biossegurança com exames diagnósticos rápidos e confiáveis.

No que se refere aos baixos índices produtivos, esses se devem a vários fatores, dentre eles a reduzida tecnificação empregada nos rebanhos, e a constante presença de enfermidades infecciosas, como por exemplo: brucelose, mastite subclínica, tuberculose, verminoses, toxoplasmose, linfadenite caseosa, leptospirose, dentre outras. Dessa forma, essas deficiências sanitárias envolvidas no processo produtivo da caprinocultura brasileira necessitam de resolução.

No contexto da doenças infectocontagiosas, destaca-se a leptospirose por ser um crescente problema de saúde pública e veterinária, bastante disseminado e de curso agudo nos humanos; nos animais é responsável por abortamentos, nascimento de crias fracas e prematuras, redução na produção de leite e carne, sendo essas as principais causas de redução dos índices produtivos desses rebanhos.

Sendo responsabilidade das entidades de pesquisa e de extensão o desenvolvimento de subsídios (meios de diagnóstico, levantamento de dados, assistência técnica eficiente, instruções eficientes de profilaxia e controle das doenças) que auxiliem os produtores a atender as exigências deste, cada vez mais exigente, mercado consumidor.

O Matadouro Público Municipal de Patos/PB, por ser um excelente ambiente para vigilância das doenças infectocontagiosas, objetivou-se determinar a frequência de anticorpos e isolar *Leptospira* spp. a partir de amostras do trato geniturinário de cabras abatidas no Matadouro Público Municipal de Patos – PB.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Agente Etiológico

As bactérias causadoras da leptospirose estão classificadas na ordem Spirochaetales, família Leptospiraceae e gênero *Leptospira*. Até o ano de 1988, esse gênero era dividido em duas espécies: uma composta pelas cepas saprófitas que são encontradas no ambiente (*Leptospira biflexa*) e a outra por estirpes patogênicas (*Leptospira interrogans*) (LEVETT, 2001), tendo como critério características relativas ao crescimento em diferentes condições de cultivo, posteriormente, esta classificação foi modificada. Este gênero é composto por bactérias gram-negativas, em forma helicoidal com extremidades em forma de gancho, medindo aproximadamente 0,1 µm de diâmetro x 6 a 20 µm de comprimento (LEFEBVRE, 2003). Apesar destas serem gram-negativas não se coram o suficiente, com exceção do corante a base de prata, tendo que utilizar outras formas de visualização como campo escuro ou microscópio de contraste de fase (LEVETT, 2001; QUINN et al., 2005).

Baseado nas diferentes combinações de antígenos presentes no envelope externo das leptospiros constituídos por lipopolissacarídeos, sua identificação passou a ser possível pelas características de virulência e sorológicas, possibilitando a classificação em sorogrupos e sorovares. Presumindo-se a existência de aproximadamente 300 sorovares de leptospiros inseridas em 25 sorogrupos (AHMED et al., 2006).

Com a análise da homologia do DNA e a criação de técnicas moleculares, ocorreu a reclassificação das leptospiros em 19 genomespecies, não condizendo mais as espécies anteriores, já que dentro de uma mesma espécie é possível que exista sorovares patogênicos e não patogênicos (SOTO et al., 2007). Após esta mudança, passou-se a classificar 13 espécies patogênicas: *L. alexanderi*, *L. alstonii*, *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans* (*sensu estrito*), *L. fainei*, *L. kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. terpstrae*, *L. weilii* e *L. wolffi*, com mais de 260 sorovares. As espécies saprófitas incluem *L. biflexa* (*sensu estrito*), *L. meyeri*, *L. yanagawae*, *L. kmetyi*, *L. vanthielii* e *L. wolbachii*, com mais de 60 sorovares (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

As leptospiros não conseguem se multiplicar em ambiente externo, porém conseguem sobreviver em ambientes aquáticos, solos úmidos, com baixa incidência solar, pH levemente alcalino e baixa salinidade, se mantendo viáveis por até 6 meses. Essas bactérias são sensíveis à desinfetantes químicos, excesso de raios UV, a temperatura, não sobrevivendo a temperaturas menores que 10 °C e maiores que 36 °C; ao pH ácido, sendo inibidas quando este estiver abaixo de 6,0 ou acima de 8,0 (LANGONI, 1999; GOMES, 2013).

2.2 Aspectos Epidemiológicos

A leptospirose é a zoonose de difusão mais ampla em todo o globo, estando presente em todos os continentes, com a exceção da Antártida. Já foram encontradas evidências de portadores de *Leptospira* spp. em praticamente todas as espécies mamíferas examinadas, sendo os roedores os principais reservatórios para estes agentes infecciosos que estão em evolução juntamente com os hospedeiros, adaptando-se completamente a algumas espécies da fauna silvestre que não sofrem com a enfermidade e não morrem pela infecção, por essa questão constituem fontes de infecção e importantes hóspedes para a manutenção deste patógeno virulento, praticamente por toda vida (PETRAKOVSKY; CARPINETTI; ANTONUCI, 2015).

Vários fatores colaboram para o aparecimento da leptospirose, como por exemplo a topografia da região, temperatura, umidade, precipitações pluviométricas, a presença de espécies selvagens que servem de reservatórios, a exemplo de preás, raposas, gambás, dentre outros, e reservatórios domésticos, existindo transmissão entre diferentes espécies (ALVES, 2000).

Essa zoonose é vista como uma doença ocupacional importante, que afeta especialmente os agricultores, trabalhadores de matadouros, comerciantes de animais de estimação, veterinários, coletores de lixo e trabalhadores de esgoto (HARTSKEERL; COLLARES-PEREIRA; ELLIS, 2011).

Os transmissores podem ser animais selvagens ou domésticos, especialmente roedores e marsupiais pequenos, bovinos, suínos e cães, existindo relatos que sugerem que animais domésticos que dividem o mesmo ambiente com roedores silvestres, estão mais expostos aos agentes patológicos, em decorrência da contaminação ambiental provocada por esses portadores assintomáticos. As leptospirosas patogênicas habitam os túbulos proximais renais, mas também outros tecidos e órgãos que podem também servir como uma via de disseminação do agente. A partir dos rins, as leptospirosas são excretadas junto com a urina e podem então contaminar o solo, a água, córregos e rios de superfície, ocorrendo infecções de animais ou seres humanos a partir do contato direto com esses contaminantes. Os seres humanos quase nunca se tornam portadores crônicos, mas sofrem infecções agudas, às vezes com sequelas em longo prazo (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; FERNANDES et al., 2013).

2.3 Patogenia

O agente penetra geralmente pela pele lesada, por pequenos cortes ou abrasões, através de membranas ou mucosas, como a conjuntiva ou da pele úmida e até mesmo da pele íntegra. Após a entrada no organismo, disseminam-se por via hematogênica e tem início a fase de

leptospiremia, levando a um nível crítico de bactérias, através da multiplicação no sangue e em diversos órgãos, como fígado e baço, com duração de quatro a cinco dias, dificilmente indo além do sétimo dia. Pode ocorrer reação imunitária do hospedeiro, que antagoniza a *Leptospira* spp. e faz com que o agente encontre abrigo em algumas áreas do organismo onde a imunidade humoral é inexistente, ou é presente em baixos níveis. A câmara anterior do globo ocular, a luz dos túbulos renais, o sistema nervoso central e o aparelho reprodutor, são os principais locais de refúgio. O acometimento renal caracteriza a fase de leptospirúria, que se inicia entre o sétimo e o décimo dia da evolução da doença. Neste momento, ocorre a formação de imunocomplexos e reação inflamatória, levando vários órgãos a uma vasculite generalizada, principalmente o fígado, rins, coração, pulmões e órgão reprodutivos (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; HIGINO; AZEVÊDO, 2014).

2.4 Sinais Clínicos

As características clínicas da leptospirose na espécie humana são variáveis e não específicas, desde uma gripe leve, até uma sepse grave com posterior choque séptico. Os sinais e sintomas da leptospirose podem se assemelhar aos de outras enfermidades dos trópicos, incluindo dengue, tifo e malária, resultando em um diagnóstico clínico impreciso. A confirmação diagnóstica é muitas vezes diferente em grande parte do mundo, levando a uma má compreensão epidemiológica da doença (DESAKORN et al., 2012).

De acordo com Lilenbaum et al. (2007a), a Leptospirose em caprinos pode se apresentar mais raramente na forma aguda, com um aumento da temperatura corporal, anorexia, depressão, icterícia, anemia ou síndromes hemorrágicas. Sendo a forma crônica mais frequente e a que causa maiores perdas econômicas, ficam com a fertilidade prejudicada, ocorrem mortes neonatais, abortos e diminuição na produção de leite.

2.5 Patologia

A leptospirose tem como característica o desenvolvimento de vasculite e acomete principalmente os rins, fígado, coração e pulmões (LEVETT, 2001). As lesões encontradas nos rins são determinadas por necrose tubular e nefrite intersticial (GOMPF et al., 2016), esta sendo caracterizada por células mononucleares e poucos neutrófilos (TOCHETTO et al., 2012); no fígado é encontrado necrose centrolobular e hiperplasia das células de Kupffer (GOMPF et al., 2016), por consequência, o desenvolvimento de icterícia; miocardite intersticial com infiltrado linfocítico no coração e nos pulmões, há existência de hemorragia e congestão (LEVETT, 2001).

2.6 Diagnóstico

2.6.1 Clínico

O diagnóstico da leptospirose é difícil tanto de forma clínica como laboratorial, em decorrência da não especificidade da sintomatologia apresentada, sendo muitas vezes apenas presuntivo. Sua confirmação só é possível através da realização de diferentes métodos laboratoriais, com isso a doença frequentemente não é reconhecida e por conseguinte muitas vezes negligenciada (FAINE et al., 2000; LEVETT, 2001; HARTSKEERL; COLLARES-PEREIRA; ELLIS, 2011; HIGINO; AZEVEDO, 2014).

Pelo fato da doença apresentar comportamento bifásico, é importante considerar que na fase inicial, a septicêmica, os agentes podem ser encontrados no sangue, líquido e em quase todos os tecidos. Na segunda fase, ou crônica, devido ao aparecimento dos anticorpos séricos, as leptospirosas ficam restritas aos locais de baixa atividade imunológica, e passarão a ser eliminadas na urina, no sêmen e nas secreções vaginais (FAINE et al., 2000; LEVETT, 2001). Sendo de extrema importância a atenção com a fase que se encontra o animal quando se vai solicitar e interpretar os exames laboratoriais (HIGINO; AZEVEDO, 2014).

2.6.2 Diagnóstico Sorológico

A Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) considera o teste de Soroaglutinação Microscópica (SAM) como padrão-ouro para o diagnóstico sorológico da leptospirose (LEVETT, 2001; OIE, 2012).

Os anticorpos produzidos contra um sorovar não são específicos, entretanto, a presença de reação cruzada é possível, surgindo coagulações com reações sinérgicas para dois ou mais sorovares, o que atrapalha a identificação do sorovar causador da infecção (HAGIWARA, 2003). No conjunto de antígenos usados no teste SAM, é aconselhado que esteja incluso pelo menos um representante de cada sorogrupo, com a intenção da infecção não passar despercebida (HIGINO; AZEVEDO, 2014).

Vários testes diagnósticos sorológicos rápidos foram desenvolvidos como alternativas, dos quais um comercial, o *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) é promissor, podendo ser realizado em vários laboratórios ao longo dos trópicos, e tem um menor custo quando comparado a SAM (DESAKORN et al., 2012).

Foi usado experimentalmente por Hartman et al., (1984) um teste para cães que detectava os anticorpos IgG e IgM. A IgM (resposta inespecífica) se eleva após uma semana da

infecção, e o título maior acontece dentro de 14 dias, com posterior diminuição, e a IgG (resposta específica) se eleva gradativamente até atingir o título máximo em dois ou três meses. Sugeriu-se que o teste era adequado para fins de sorodiagnóstico, em particular para o diagnóstico de uma infecção recente em um indivíduo.

O teste ELISA (IgM) tem sido recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como um teste de diagnóstico sorológico da leptospirose na espécie humana, onde recursos são limitados, embora a precisão relatada é variável (DESAKORN et al., 2012).

Um Imunoensaio com Microesferas (MIA) foi testado para o diagnóstico da leptospirose na Austrália, através dele é possível diferenciar as classes IgM e IgG envolvidas nas respostas imunológica. Os testes já envolveram as espécie humana, bovina e o Diabo da Tasmânia (*Sarcophilus harrisi*). No teste com humanos o MIA se mostrou mais sensível do que a SAM e em infecções verdadeiras foi capaz de detectar níveis baixos de anticorpos nos estágios posteriores a fase aguda, além de detectar níveis mais altos de anticorpos IgM anteriores na fase imune da infecção (WYNWOOD et al., 2015; WYNWOOD et al., 2016a; WYNWOOD et al., 2016b). O mesmo teste já foi empregado no diagnóstico de outras enfermidades, como a Diarréia Viral Bovina na Suécia (XIA et al., 2010) e a infecção por Zika-Vírus nos EUA (WONG et al., 2017).

2.6.3 Exame direto em microscopia de campo escuro

O diagnóstico etiológico é feito quando se encontra o microrganismo em tecidos e líquidos corpóreos, pode ser realizado durante a primeira semana ou até os dez primeiros dias da infecção, ou seja, na fase aguda. Na fase crônica pode ser aplicado, mas com menores chances de visualização. Especialmente de três a sete dias da infecção, as leptospirosas podem ser vistas por microscopia de campo escuro em exames diretos de sangue, exsudato peritoneal e pleural, pelo fato delas ainda não terem sofrido a ação de anticorpos específicos. Dentre as vantagens do exame de observação direta podemos citar a agilidade no diagnóstico decorrente do curto período pós-infecção, em que possivelmente encontra-se um resultado conclusivo; em contrapartida, a subjetividade da interpretação dos resultados é uma desvantagem, tendo em vista que coleções de fibrina e outras proteínas podem ser confundidas com leptospirosas (FAINE et al., 2000; HIGINO; AZEVEDO, 2014).

2.6.4 Inoculação em animais de laboratório

As leptospiros patogênicas causam o quadro agudo da doença em animais de laboratório suscetíveis, por este motivo são usados para o isolamento primário a partir de materiais clínicos. A espécie de hamster, *Mesocricetus auratus*, é a mais sensível à ação das leptospiros, morrendo em aproximadamente quatro dias após a inoculação, por esse motivo é a de eleição para o isolamento do microrganismo (ENRIETTI, 2001).

De acordo com Macedo et al. (2004), uma das vias de melhores resultados para inoculação do agente é a intraperitoneal, por ser mais eficiente no estabelecimento e evolução de infecções experimentais pelos variados sorovares de leptospiros patogênicas para estes animais.

2.6.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O uso de técnicas de análise molecular como PCR ou qPCR surge como uma ótima alternativa para detectar um grande número de microrganismos através dos seus DNAs, incluindo a *Leptospira* spp. Como vantagens, podemos citar que em decorrência da alta sensibilidade e especificidade, é possível ser executada com segurança numa grande quantidade de modelos, como tecido renal e urina, muitas vezes tornando-se uma alternativa rápida comparada às demais formas de diagnóstico, acelerando a velocidade em que se chega a um resultado conclusivo (STODDARD et al., 2009; HAMOND et al., 2014; LANGONI et al., 2015).

De acordo com Smythe et al. (2002) o uso da sonda fluorogênica TaqMan torna o ensaio sensível e parece ser possível diferenciar as espécies patogênicas e não patogênicas, com precisão.

Lilenbaum et al. (2008a) relataram que a técnica pode ser aplicada inclusive quando os microrganismos já sofreram lise, e estão sem condições de serem isolados pelos métodos de cultivo. Aplicando a PCR em tempo real, é possível quantificar o número de organismos alvo, ou seja, quantificar o tamanho da infecção (SMYTHE et al., 2002).

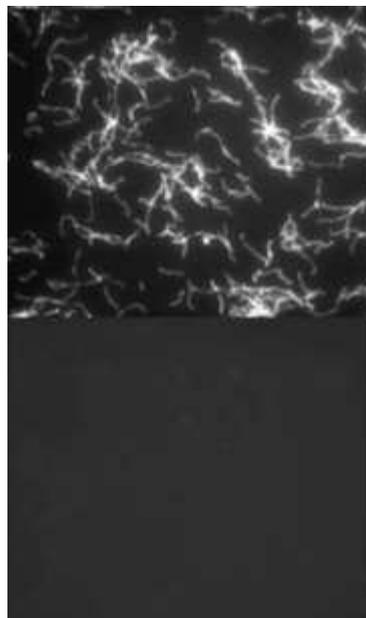
Lilenbaum et al. (2009) recomendaram o uso da soroaglutinação microscópica como teste de rotina, com posterior PCR de urina para a detecção direta do DNA de leptospiros, portanto esta metodologia pode ser aplicada para a identificação de caprinos e ovinos portadores. Por conseguinte esses dois métodos podem ser utilizados como excelentes recursos empregados no controle da leptospirose em pequenos ruminantes.

2.6.6 Imunofluorescência

Neste processo proteínas celulares (antígenos alvo), são usados para a ligação do anticorpo acoplado a fluorescência, sinalizando e caracterizando a ligação, que é chamada de complexo imune designado. Os anticorpos primários se ligam aos antígenos alvos, em uma unidade acoplada, um sistema de detecção de cores capta a ligação (imunofluorescência direta) ou quando um anticorpo secundário, ou auto anticorpo, acoplado a fluorescência se liga ao primário que por sua vez está ligado ao antígeno alvo (imunofluorescência indireta) (LEFÈVRE; LANGE, 2011).

O procedimento detecta especificamente anticorpos ligados à superfície de leptospiras (Figura 11): anti-soros para LipL31, uma lipoproteína associada com a membrana interna, e a proteína de choque de térmico citoplasmática GroEL (RISTOW et al., 2007).

Figura 1 - Reações de imunofluorescência positiva e negativa.



Fonte: RISTOW et al. (2007).

De acordo com Grooms e Bolin (2005), a imunofluorescência pode ser utilizada para identificar a presença de leptospiras em tecidos como: fígado adulto e fetal, pulmão, rim, placenta ou urina e sedimentos. Como vantagem, cita que o ensaio é rápido, tem sensibilidade razoável, com a possibilidade de ser utilizado em amostras que já foram congeladas. Sendo que a interpretação dos resultados requer um técnico de laboratório qualificado. O conjugado de anticorpo fluorescente disponíveis para utilização geral não é específica para um sorotipo.

2.6.7 Isolamento do agente

O isolamento bacteriano é a forma de diagnóstico mais segura, sendo o definitivo para a doença, mas apresenta baixa sensibilidade, ou seja, com maiores chances de falso negativo, necessitando de amostras recém-colhidas que devem ser observadas por um tempo mínimo de 42 dias, tornando o resultado tardio (LEVETT, 2001; HARTSKEERL; COLLARES-PEREIRA; ELLIS, 2011; HIGINO; AZEVEDO, 2014). O isolamento de leptospiras a partir de animais assintomáticos não é um trabalho fácil, tanto em decorrência de dificuldades inerentes ao crescimento da bactéria quanto pela possibilidade da contaminação das amostras de urina. Além disso, a excreção de bactérias viáveis pela urina acontece com interrupções e somente durante um reduzido e incerto período após a contaminação. Estes são os motivos que fazem com que a maioria dos estudos de leptospirose animal se baseie apenas nos métodos sorológicos e moleculares (FAINE et al., 2000; HIGINO; AZEVEDO, 2014). O cultivo de *Leptospira* spp. é demorado, necessitando de meio de cultura apropriado. No entanto, o isolamento do organismo a partir do animal permite a identificação definitiva do sorovar infectante (GROOMS; BOLIN, 2005).

2.6.8 Imuno-histoquímica (IHC)

O método se baseia numa imunocoloração de amostras de tecidos fixados em formaldeído. São necessários para a sua execução o peróxido de hidrogênio 3%, proteinase K, soro de coelho com anticorpos anti-*Leptospira* spp., streptavidina-biotina, um cromógeno e hematoxilina de Harris. Após o processamento as amostras são analisadas, onde fica evidente a presença ou ausência de *Leptospira* spp.. É empregado no teste um controle positivo e um negativo (SHEARER et al., 2014).

A técnica de IHC pode ser usada para detectar *Leptospira* spp. em tecidos, mas não fornece informações sobre o sorovar da leptospira presente (SHEARER et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2016).

2.7 Controle e Profilaxia

O Ministério da Saúde (BRASIL, 2014) recomenda que as medidas devem ser direcionadas aos reservatórios do agente, à melhoria das condições de proteção dos trabalhadores expostos, às condições higiênico-sanitárias da população, e às medidas corretivas sobre o meio ambiente, reduzindo a capacidade de suporte para a instalação e proliferação de roedores, que são os principais portadores e disseminadores do agente. Ressalta a importância dos cuidados com os animais de produção e companhia acometidos pela doença, recomendando a segregação e o tratamento.

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. Sendo de grande importância, quando não se conhece a condição sorológica, a manutenção dos animais em quarentena por quatro semanas para posterior teste antes de serem introduzidos no rebanho. Contudo, uma relevante medida de controle é o bloqueio da introdução de animais portadores da bactéria nos rebanhos, entretanto, em decorrência das características epidemiológicas da doença em caprinos e ovinos, essa tarefa torna-se bastante complicada. As medidas gerais, como o cuidado com a limpeza do ambiente, são interessantes para diminuir as chances de contaminação dos animais (HAGIWARA, 2003).

A imunidade na leptospirose é predominantemente humoral mediada em humanos e na maioria das espécies animais, incluindo cães, porcos, cobaias e hamsters (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

Existem vacinas disponíveis comercialmente para bovinos, cães e suínos são baseadas em células inteiras mortas, não fornecem proteção cruzada contra diferentes sorotipos, só conferem imunidade de curto prazo e geralmente não conseguem evitar a transmissão da doença (ALVES, 2000; HARTSKEERL; COLLARES-PEREIRA; ELLIS, 2011; OLIVEIRA et al., 2015; SESSIONS; GREENE, 2004). Os esforços para desenvolver vacinas recombinantes contra a leptospirose se concentraram em proteínas conservadas da membrana externa (OMPs), que representam alvos potenciais para os mecanismos imunológicos de defesa. Várias proteínas de *Leptospira* spp. foram avaliadas como candidatas a vacinas, no entanto nenhum antígeno

amplamente conservado foi capaz de induzir imunidade protetora a longo prazo (OLIVEIRA et al., 2015).

Diante disso, uma proteína conservada da membrana de *L. interrogans*, a OMP L37, cumpre vários requisitos para um potencial candidato a vacina. Foi recentemente caracterizada como uma proteína de superfície da célula exposta, que se liga a vários componentes da matriz extracelular e tem uma maior afinidade para a elastina. Alguns tecidos são ricos em elastina, como por exemplo, pele, pulmões, artérias e bexiga e são altamente relevantes para a patogênese e transmissão da leptospirose (OLIVEIRA et al., 2015).

As vacinas de DNA e subunidades representam potenciais estratégias de intervenção para leptospirose e têm sido extensivamente avaliadas. Ambas são capazes de induzir uma resposta imune humoral, e as de DNA de estimular a imunidade mediada por células (OLIVEIRA et al., 2015).

Os Lipopolissacarídeos (LPS) são importantes antígenos reconhecidos por soros compatíveis de humanos e animais, justificando que a imunidade após uma infecção adquirida naturalmente é restrita a sorovares com LPS sorologicamente relacionados. Os mecanismos de imunidade nos bovinos diferem das demais espécies, onde animais com elevados níveis de anticorpos aglutinantes no soro não são protegidos da infecção por via conjuntival. Em vez disso, a imunidade está relacionada com uma resposta do linfócito T *helper*-1 (Th1), mediada pela liberação de IFN- γ , tendo como consequência implicações no desenvolvimento de vacinas para proteção de bovino (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

Conforme relatado por Sessions e Greene (2004), reações anafiláticas como edema facial, prurido, hipotensão, ou dispneia podem ser observadas após a administração de vacinas de leptospirose.

2.8 Tratamento

O tratamento em humanos consiste em altas doses de penicilina G e em casos leves à moderados pode-se fazer o uso de tetraciclina. Podendo ser necessário fluidoterapia e hemodiálise (HÜTTNER; PEREIRA; TANAKA, 2002). Em cães utiliza-se inicialmente a penicilina ou um fármaco derivado desta, porém esta não elimina o estado de portador, devendo utilizar a tetraciclina ou doxiciclina para que o animal deixe de ser portador (SESSIONS; GREENE, 2004). Com bezerros e bovinos adultos em fase aguda é recomendado utilizar estreptomicina ou dihidroestreptomicina (GIRIO e LEMOS, 2007).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local do Estudo

O presente estudo foi conduzido no Matadouro Público Municipal de Patos-PB, onde se abate animais deste município e dos circunvizinhos. As análises laboratoriais foram conduzidas no Laboratório de Doenças Transmissíveis (LDT) do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), em Patos-PB (Latitude: 07° 01' 28'' S, Longitude: 37° 16' 48'' W), mesorregião do Sertão do estado da Paraíba, semiárido brasileiro.

3.2 Número de Animais

Foram amostradas 53 cabras híidas (*Capra hircus*) destinadas ao abate no Matadouro Público Municipal de Patos-PB, entre o fevereiro e novembro de 2016.

3.3 Tentativa de Isolamento

Para a tentativa de isolamento da *Leptospira* spp. foram utilizadas amostras de urina, fluido vaginal, fragmentos de rim e bexiga de todos os animais. Essas amostras foram manuseadas tomando-se todos os cuidados possíveis de assepsia e transportadas para o LDT/CSTR/UFCG em sacos de polipropileno estéreis, acondicionadas em caixa isotérmica em temperatura ambiente.

Primeiramente as amostras foram semeadas em EMJH semissólido (Difco, BD, Franklin Lakes, NJ, USA), enriquecido com os antibióticos anfotericina B (0,05 mg/mL), 5-fluorouracil (1mg/mL), fosfomicina (4 mg/mL), trimetoprim (0,2 mg/mL), sulfametoxazol (0,4 mg/mL), de modo que a concentração de antibióticos alcançasse 10% (CHAKRABORTY et al., 2010). Após 24 horas de incubação em estufa bacteriológica com temperatura entre 28 e 30°C, 0,5 mL das amostras foram submetidas a diluição (repique) em meio semissólido Fletcher (Difco, BD, Franklin Lakes, NJ, USA) acrescido de 5-Fluorouracil (1mg/mL) (FAINE et al., 2000; COSTA, 2015).

As amostras de urina foram puncionadas diretamente das bexigas após a abertura da cavidade, usando-se seringas estéreis de 5 mL, e armazenadas em tubos do tipo Falcon estéreis de 15 mL. Imediatamente após a chegada ao LDT/CSTR/UFCG, foram centrifugadas à 3000 rpm durante dez min e posteriormente 0,5 mL do sedimentado semeado em EMJH semissólido enriquecido com antibióticos. O volume coletado era variável em função da quantidade presente nas bexigas.

Os fluidos vaginais foram colhidos com o uso de suabes estéreis e espéculos vaginais descartáveis estéreis. Após a impregnação com a amostra, foram removidos e colocados em tubos do tipo Falcon estéreis de 15 mL contendo 5 mL de Solução Salina Tamponada de Sorensen estéril, imediatamente após a chegada ao LDT/CSTR/UFCG, foram centrifugadas à 3000 rpm durante dez min e posteriormente 0,5 mL do sedimentado semeado em EMJH enriquecido com antibióticos, adaptação feita a partir de metodologia descrita por Lilenbaum et al. (2008a).

Após a chegada ao LDT/CSTR/UFCG e ao processamento das amostras de urina e dos fluidos vaginais, os fragmentos de rim foram macerados com o uso de seringas descartáveis estéreis de 3 mL, posteriormente um volume macerado de 0,5 mL foi semeado em EMJH semissólido enriquecido com antibióticos.

As bexigas tiveram suas mucosas raspadas com lâminas de bisturi nº 24 estéreis, posteriormente estes raspados mucosos foram semeados em EMJH semissólido enriquecido com antibióticos.

3.4 Soros Sanguíneos

As amostras de sangue foram coletadas no momento da sangria dos animais utilizando-se tubos de 8 mL estéreis. Após a chegada ao LDT/CSTR/UFCG, foram centrifugadas à 3000 rpm durante dez minutos. Realizado o dessoramento, as amostras foram congeladas a -20° C. Após o término das coletas, todos os soros foram descongelados e submetidos ao teste de Soroaglutinação Microscópica (SAM).

3.5 Leituras

3.5.1 Macroscópica

Foram realizadas leituras macroscópicas semanalmente através das quais foram observadas a presença de contaminantes nos tubos semeados ou formações de anéis de turvação (Anéis de Dinger) característicos no crescimento de *Leptospira* spp. no meio Fletcher.

3.5.2 Microscópica

Foram realizadas leituras microscópicas semanalmente com auxílio de microscópio com condensador de campo escuro.

Em capela estéril, tomando-se os devidos cuidados assépticos, foram preparadas lâminas de microscopia contendo uma gota da amostra. A seguir as lâminas foram examinadas,

percorrendo-se todo o campo da gota a procura de evidências de leptospiras, utilizando se as objetivas de 10X, 20X e 40X.

As amostras só foram desprezadas após completarem doze semanas sem que houvesse crescimento ou evidências de leptospiras.

3.6 Técnica da Soroaglutinação Microscópica (SAM)

A presença de anticorpos anti-*Leptospira* spp. foi determinada pela técnica de soroaglutinação microscópica (SAM) (OIE, 2012), utilizando como antígenos uma coleção de cepas patogênicas cedidas pelo Laboratório de Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal Fluminense (UFF), oriundas do Instituto Pasteur, França (Quadro 1).

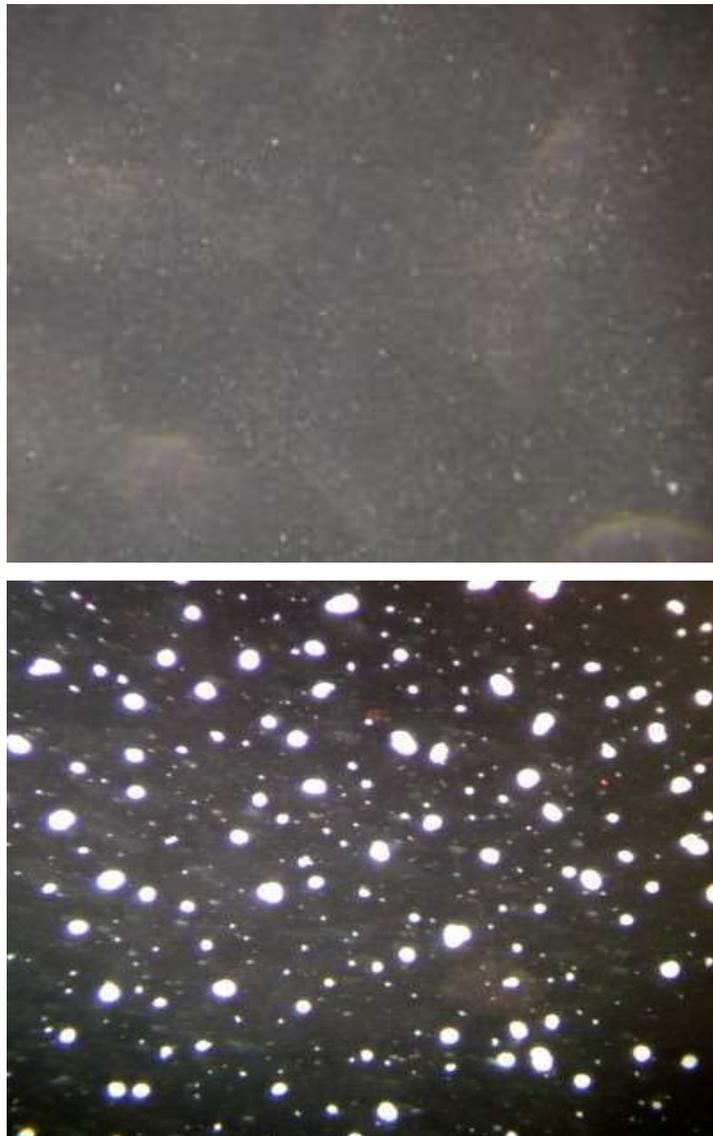
Quadro 1 Coleção de cepas patogênicas cedidas pelo Laboratório de Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal Fluminense (UFF), oriundas do Instituto Pasteur, França.

| ESPÉCIE | SOROGRUPO | SOROVAR |
|--------------------------|---------------------|---------------------|
| <i>L. interrogans</i> | Australis | Australis |
| | Icterohaemorrhagiae | Copenhageni |
| | Bataviae | Bataviae |
| | Australis | Bratislava |
| | Canicola | Canicola |
| | Djasiman | Djasiman |
| | Sejroe | Hardjoprajitno |
| | Pomona | Pomona |
| | Pomona | Kennewicki |
| | Icterohaemorrhagiae | Icterohaemorrhagiae |
| | Hebdomadis | Hebdomadis |
| | Sejroe | Wolffi |
| | Autumnalis | Autumnalis |
| <i>L. borgpetersenni</i> | Ballum | Castellonis |
| | Serjroe | Hardjobovis |
| | Tarassovi | Tarassovi |
| | Sejroe | Sejroe |
| <i>L. santarosai</i> | Sejroe | Guaricura |
| <i>L. noguchii</i> | Panama | Panama |

Fonte: Laboratório de Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal Fluminense – UFF.

Todas as amostras com atividade aglutinante na diluição de 1:100 foram consideradas positivas (Figura 1). As amostras positivas foram tituladas de forma seriada na razão de dois. O ponto de corte foi o tubo de maior diluição que apresentou 50% de aglutinações quando comparado com o controle. O maior título alcançado foi usado para identificar o sorogrupo infectante. Amostra positiva na SAM (FAINE, 2000)

Figura 2 – Amostra negativa e positiva na SAM, respectivamente.



Fonte: Faine et al. (2000).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 53 cabras amostradas, sete (13,61%) foram soro reativas no teste de Soroaglutinação Microscópica (SAM) para pelo menos um sorovar, com títulos de 100 (71,43% - 5/7) e 200 (28,57% - 2/7).

As reações ocorreram para os sorovares Icterohaemorrhagiae (28,57% - 2/7), Autumnnalis (28,57% - 2/7), Tarassovi (28,57% - 2/7) e Copenhageni (14,28% - 1/7), portanto em se tratando de um teste sorogrupo específico, foram detectados anticorpos contra os seguintes sorogrupos: Icterohaemorrhagiae (42,85%), Autumnnalis (28,57%) e Tarassovi (28,57%). Os títulos de 200 ocorreram para os dois sorovares que representaram o sorogrupo Icterohaemorrhagiae (Tabela 1).

Tabela 1 Resultado da tentativa de isolamento de *Leptospira* spp. e da Soroaglutinação Microscópica (SAM) realizadas a partir de amostras de cabras abatidas no Matadouro Público Municipal de Patos-PB entre fevereiro e novembro de 2016.

| ANIM. | Leitura Macrosc. | | | | Leitura Microsc. | | | | Tít. SAM | Sorogrupo Reagente | Sorovar Reagente |
|-------|------------------|---|---|---|------------------|---|---|---|----------|--------------------|-------------------|
| | R | B | U | F | R | B | U | F | | | |
| | 6 | - | - | - | - | - | - | - | | | |
| 7 | - | - | - | - | - | - | - | - | 100 | Autumnalis | Autumnalis |
| 9 | - | - | - | - | - | - | - | - | 200 | Icterohaemorrhag. | Copenhageni |
| 10 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 23 | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 25 | - | - | - | - | + | - | - | + | 100 | Autumnnalis | Autumnalis |
| 29 | - | - | - | - | - | - | - | - | 100 | Tarassovi | Tarassovi |
| 34 | + | + | - | - | + | + | - | - | 200 | Icterohaemorrhag. | Icterohaemorrhag. |
| 39 | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 40 | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 46 | - | + | - | - | - | + | - | - | - | - | - |

| | | | | | | | | | | | |
|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|-------------------------------------|
| 47 | - | + | - | - | - | + | - | - | - | - | - |
| 53 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 100 | Icterohaemorrhag. Icterohaemorrhag. |

Cultura positiva (+); Cultura negativa (-)
 Legenda: R – rim; B – bexiga; U – urina; F – fluido vaginal.

Na tentativa de isolamento foram trabalhadas 212 culturas, com amostras de rim, bexiga, urina e fluido vaginal. Macroscopicamente 8 culturas demonstraram presença de um anel de turvação, semelhantes ao anel de Dinger, característico do crescimento do agente em questão no meio Fletcher (Figura 2).

Figura 3 - Turvação macroscópica da cultura de rim da cabra 34.



Fonte: Laboratório de Doenças Transmissíveis/CSTR/UFCG.

Aprofundando a análise microscópica, chegou-se à conclusão que seis culturas deveriam ser consideradas positivas, sendo duas de rim, três de bexiga, uma de fluido vaginal, onde foram visualizados microrganismos com morfologia semelhante à da *Leptospira* spp.. Porém, técnicas moleculares são necessárias para se chegar a confirmação do diagnóstico, bem como a

tipificação do agente. Houve formação de anéis de turvação em quatro amostras consideradas positivas na análise microscópica.

Nas demais amostras foram visualizados microrganismos tais como: bacilos, protozoários, hifas septadas, entre outros contaminantes.

Em demais levantamentos sorológicos semelhantes realizados também no Matadouro Público Municipal de Patos-PB por Araújo Neto (2005), Higino et al. (2010) e Costa et al. (2017), com 100, 49 e 80 ovinos, constataram frequências de 9%, 7,5% e 8,2%, respectivamente. Onde reações para os sorogrupos Autumnalis, Icterohaemorrhagiae foram encontradas. Apesar da espécie estudada ser distinta, houve aproximação dos resultados.

Comparando-se a frequência de soropositivos encontrada com as de outros estudos da mesma natureza realizados no estado da Paraíba, Alves (1996) a partir de um estudo realizado em quatro microrregiões do estado, utilizando-se de um total de 1210 caprinos, encontrou uma frequência de 16,19%, consistindo na frequência mais elevada na espécie caprina já encontrada no estado.

Demais estudos no estado da Paraíba apresentaram frequências de aglutininas variando entre 5,1% e 9% (FAVERO et al., 2002; ARAÚJO NETO 2005; HIGINO et al., 2010; ALVES et al., 2012; HIGINO et al., 2012; COSTA et al., 2016; COSTA et al., 2017). Levando-se em conta a predominância encontrada dos sorogrupos Icterohaemorrhagiae (42,85%), neste caso representado pelos sorovares Icterohaemorrhagiae (28,57%) e Copenhageni (14,28%), e do sorogrupo Autumnalis (28,57%), em parte condizem com alguns estudos anteriores desenvolvidos na Paraíba, onde constataram reações contra os sorogrupos Autumnalis e Icterohaemorrhagiae.

Pesquisas realizadas também na Paraíba por Alves et al. (2012), com 1275 ovinos, Higino et al. (2012), com 975 caprinos e Costa et al. (2016), com 500 caprinos e 500 ovinos, constataram frequências de anticorpos anti-*Leptospira* spp. variando entre 5,41 e 11,2%. Reações contra os sorogrupos Autumnalis, e Icterohaemorrhagiae foram bastante representativas nestes estudos.

Os estudos acima citados não constataram a presença de reações contra o sorogrupo Tarassovi. As reações positivas encontradas contra os sorogrupos Icterohaemorrhagiae, Autumnalis e Tarassovi, apesar do desconhecimento do histórico dos animais amostrados no presente estudo por se tratar de animais de matadouro, possivelmente ocorreram em decorrência do compartilhamento do mesmo ambiente entre caprinos, ovinos, suínos e ratos, visto que de acordo com pesquisas anteriores existe uma correlação entre determinadas espécies e

sorogrupos específicos (ALVES, 2000; RAMOS; SOUZA; LILENBAUM, 2006; ALVES et al., 2012; SANTOS et al., 2012; PETRAKOVSKY; CARPINETTI; ANTONUCI, 2015).

De acordo com outras pesquisas realizadas nos estados do Ceará, São Paulo, Rio Grande do Norte, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Santa Catarina, Pernambuco, Sergipe e Piauí, foram encontradas frequências de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em caprinos e ovinos variando entre 0,7% e 47,4%, onde na maioria dos estudos a presença de reações contra os sorogrupos Autumnalis e Icterohaemorrhagiae foram notadas, mas contra o Tarassovi foi constatada apenas no Pernambuco, Piauí e Minas Gerais (FAVERO et al., 2002; AZEVEDO et al., 2004; LILENBAUM et al., 2007a; LILENBAUM et al. 2008b; ARAÚJO NETO et al., 2010; SANTOS et al., 2012; MARTINS et al., 2012; TOPAZIO et al., 2015; MACHADO et al., 2016; ALVES et al., 2017; RIZZO et al., 2017; CAMPOS et al., 2017).

A oscilação entre as prevalências encontradas no Brasil se devem a diversos fatores relacionados com cada situação estudada, como por exemplo, regiões com condições ambientais particularmente distintas, diferentes épocas de amostragem, diferentes susceptibilidade dos genótipos estudados, representatividade da amostragem empregada, diferentes formas de manejo dos animais e presença de espécies mantenedoras (ALVES, 1996; ALVES, 2000; HIGINO; AZEVEDO, 2014; COSTA et al., 2016; RIZZO et al., 2017).

No Brasil, até o presente momento só foram isoladas duas cepas de *Leptospira* spp. e outros dois microrganismo com morfologia semelhante em pequenos ruminantes. No Rio Grande do Sul a cepa foi identificada através de diagnóstico molecular como pertencente ao sorogrupo Autumnalis (SILVA et al., 2007). No Rio de Janeiro a suspeita era que a cepa pertencia ao sorogrupo Grippotyphosa (LILENBAUM et al., 2007a). Na Paraíba, em um estudo envolvendo 80 ovinos abatidos no Matadouro Público Municipal de Patos-PB, a partir de uma placenta e de uma ampola do ducto deferente, foram isoladas bactérias morfológicamente semelhantes à *Leptospira* spp. (HIGINO et al., 2010).

Os baixos títulos de anticorpos anti-*Leptospira* spp. encontrados no presente estudo, semelhante aos constatados por Azevedo et al. (2004), Lilenbaum et al. (2007b), Araújo Neto et al. (2010), Santos et al. (2012), Topazio et al. (2015), Machado et al. (2016), Costa et al. (2016), Costa et al. (2017) e Rizzo et al. (2017). Por se tratar de animais clinicamente hígidos, que não demonstram sinais clínicos evidentes, sugerem uma apresentação crônica da doença ou a resistência da espécie, o que do ponto de vista epidemiológico é muito importante, visto que os portadores crônicos são grandes responsáveis pela manutenção do agente no ambiente, reforçando a necessidade de constantes estudos sorológicos e tentativas de isolamento da bactéria nessa região. Outra questão a ser ponderada é que o título apresentado por determinadas

espécies é um fato correlacionado com o nível de exposição ao agente (ADLER, 2015), surgindo a hipótese de considerar interpretações distintas de acordo com o grau de adaptação da espécie e da realidade epidemiológica da região estudada (PICARDEAU, 2013), portando levando-se em consideração as características da região e a espécie estudada, pontos de cortes mais baixos para o diagnóstico da leptospirose em caprinos devem ser considerados.

5 CONCLUSÃO

Diante do exposto, é possível que a baixa frequência e os baixos títulos encontrados se devam as condições adversas oferecidas ao agente pelo ambiente, bem como a própria resistência dos caprinos a infecção, fazendo com que haja uma menor resposta humoral nesses animais. Portanto, em condições de clima semiárido, um ponto de corte mais baixo na prova sorológica deve ser considerado para espécie em questão. Não menos importante, estudos pontuais que busquem o isolamento e tipificação de cepas circulantes em nossa região são necessários, servindo assim como base para a construção e aplicação de estratégias de profilaxia e controle desta doença.

REFERÊNCIAS

- ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. Leptospira and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3-4, p. 287-296, 2010.
- ADLER, Ben. History of leptospirosis and leptospira. In: **Leptospira and Leptospirosis**. Springer Berlin Heidelberg, 2015. p. 1-9.
- AHMED, N. et al. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 5, n. 1, p. 28-38, 2006.
- ALVES, C. J. et al. Influência de fatores ambientais sobre a proporção de caprinos sororeatores para a leptospirose em cinco centros de criação do Estado da Paraíba, Brasil. **Biológico, São Paulo**, v. 63, n. 2, p. 11-18, 1996.
- ALVES, C. J. et al. Avaliação dos níveis de aglutininas anti-leptospira em cães no município de Patos- PB, Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 7, n. 1, p. 17-21, 2000.
- 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.
- 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**, v. 38, n. 4, p. 1933-1946, 2017.
- 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. 58 f. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Campina Grande, Patos, Paraíba, 2005.
- 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, p. 144-148, 2010.
- AZEVEDO, S. S. et al. Ocorrência de aglutininas anti-*Leptospira* em ovinos do estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 11, n. 3, 2004
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância em Saúde**. Brasília, 2014. 812 p.
- 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**, p. 1-9, 2017.
- CHAKRABORTY, A. et al. In Vitro Sensitivity and Resistance of 46 *Leptospira* Strains Isolated from Rats in the Philippines to 14 Antimicrobial Agents. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 54, n. 12, p. 5403-5405, 2010.

COSTA, D. F. **ESTUDO SOROLÓGICO E MOLECULAR DA INFECÇÃO POR *LEPTOSPIRA* spp. EM PEQUENOS RUMINANTES NO SEMIÁRIDO NORDESTINO, BRASIL.** Patos: UFCG, 2015. 67 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2015.

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.

COSTA, D. F. et al. Leptospirosis in native mixed-breed sheep slaughtered in a semiarid region of Brazil. **Ciência Rural**, v. 47, n. 2, 2017.

DESAKORN, V. et al. Accuracy of a Commercial IgM ELISA for the Diagnosis of Human Leptospirosis in Thailand. **American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 86, n. 3, p.524-527, 2012.

ENRIETTI, M. A. Contribuição ao Conhecimento da Incidência de Leptospiras em Murídeos, Caninos e Suínos no Paraná. **Brazilian Archives Of Biology And Technology**, v. 9, p.311-342, 2001.

FAINE, S. et al. **Leptospira and leptospirosis**. 2. ed. Melbourne: MediSci. 2000. 272p.

FAVERO, A. C. M. et al. Sorovares de leptospiras predominantes em exames sorológicos de bubalinos, ovinos, caprinos, eqüinos, suínos e cães de diversos estados brasileiros. **Ciência Rural**, v. 32, n. 4, p. 613-619, 2002.

FERNANDES, A. R. F. et al. Soroepidemiologia da leptospirose canina na região metropolitana de Natal, estado do Rio Grande do Norte. **Brazilian Journal Of Veterinary Research And Animal Science**, v. 50, n. 3, p.226-232, 2013.

GIRIO, R. J. S.; LEMOS, R. A. A. Doenças Bacterianas: Leptospirose. In: RIET-CORREA, F. et al. **Doença de Ruminantes e Equídeos**. 3. ed. 1. v, São Paulo: Varela, 2007. Cap. 3. p. 331-347.

GOMES, M. J. P. **Gênero *Leptospira* spp.** 2013.

GOMPF, S. G. et al. **Leptospirosis**. 2016.

GROOMS, D. L.; BOLIN, C. A. Diagnosis of Fetal Loss Caused by Bovine Viral Diarrhea Virus and *Leptospira* spp. **Veterinary Clinics Of North America: Food Animal Practice**, v. 21, n. 2, p.463-472, 2005.

HAGIWARA, M. K. **Leptospirose Canina**. São Paulo: Laboratórios Pfizer Ltda., 2003. 6 p.

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.81-85, 2014.

HARTMAN, E. G. et al. HUMORAL IMMUNE RESPONSE OF DOGS AFTER VACCINATION AGAINST LEPTOSPIROSIS MEASURED BY AN IgM- AND IgG-SPECIFIC ELISA. **Veterinary Immunology And Immunopathology**, v. 1, n. 7, p.245-254, 1984.

- HARTSKEERL, R. A.; COLLARES-PEREIRA, M.; ELLIS, W. A. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. **Clinical Microbiology And Infection**, v. 17, n. 4, p.494-501, 2011.
- 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.
- 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.
- 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.
- HÜTTNER, M. D.; PEREIRA, H. C. P.; TANAKA, R. M. Pneumonia por leptospirose. **J Pneumol**, v. 28, n. 4, p.229-232, 2002.
- IBGE. **Produção da Pecuária Municipal**. v. 42. ISSN 0101-4234. 2014.
- LANGONI, H. Leptospirose: aspectos de saúde animal e de saúde pública. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, v. 2, n. 1, p.52-58, 1999.
- LANGONI, H. et al. PESQUISA DE ANTICORPOS E DNA DE *Leptospira* spp. EM SORO CANINO. **Vet. e Zootec**, Botucatu, v. 22, n. 3, p.429-436, 2015.
- LEFEBVRE, R. B. Leptospiras. In: HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. Cap. 34. p. 174-178.
- LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p.296-326, 2001.
- LEFÈVRE, S.; LANGE, U. Immunfluoreszenz. **Z. Rheumatol**. v. 70, n. 3, p.228-231, 2011.
- LILENBAUM, W. et al. First isolation of leptospires from dairy goats in Brazil. **Brazilian Journal Of Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 507-510, 2007a.
- 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**, v. 173, n. 2, p. 408-412, 2007b.
- LILENBAUM, W. et al. Detection of Leptospira spp. in semen and vaginal fluids of goats and sheep by polymerase chain reaction. **Theriogenology**, v. 69, n. 7, p.837-842, 2008a.
- LILENBAUM, W. et al. Risk factors associated with leptospirosis in dairy goats under tropical conditions in Brazil. **Research in veterinary science**, v. 84, n. 1, p. 14-17, 2008b.
- LILENBAUM, W. et al. Identification of Leptospira spp. carriers among seroreactive goats and sheep by polymerase chain reaction. **Research In Veterinary Science**, v. 87, n. 1, p. 16-19, 2009.
- MACEDO, N., A., et al. Influência da via de inoculação sobre o estabelecimento e a evolução da leptospirose em hamsters (*Mesocricetus auratus*) experimentalmente infectados com *Leptospira interrogans* sorovar pomona. **Brazilian Journal Of Veterinary Research And Animal Science**, v. 41, n. 3, p. 194-200, 2004.

- MACHADO, A. C. et al. Análise epidemiológica da infecção por *Leptospira* spp. em ovinos no estado de Pernambuco, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, p. 01-07, 2016.
- MARTINS, G. et al. Leptospirosis as the most frequent infectious disease impairing productivity in small ruminants in Rio de Janeiro, Brazil. **Tropical animal health and production**, v. 44, n. 4, p. 773-777, 2012.
- OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 6 ed. Paris: World Organization for Animal Health. 2012. 1343p.
- OLIVEIRA, F. S. et al. Avaliação histológica e imuno-histoquímica da colonização vaginal por *Leptospira* em vacas com fluido vaginal positivo à PCR. **Rev. Bras. Med. Vet.** 2016.
- OLIVEIRA, T. L. et al. Evaluation of the *Leptospira interrogans* Outer Membrane Protein OmpL37 as a Vaccine Candidate. **Plos One**, v. 10, n. 11, p. 1-13, 2015.
- PETRAKOVSKY, J.; CARPINETTI, B.; ANTONUCI, A. 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.
- PICARDEAU, M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. **Médecine et maladies infectieuses**, v. 43, n. 1, p. 1-9, 2013.
- 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.
- RAMOS, A. C. F.; SOUZA, G. N.; LILENBAUM, W.. Influence of leptospirosis on reproductive performance of sows in Brazil. **Theriogenology**, v. 66, n. 4, p. 1021-1025, 2006.
- RISTOW, P. et al. The OmpA-Like Protein Loa22 Is Essential for Leptospiral Virulence. **Plos Pathog**, v. 3, n. 7, p. 894-993, 2007.
- RIZZO, H. et al. Frequency of and risk factors associated to *Leptospira* spp. Seropositivity in goats in the state of Sergipe, Northeastern Brazil. **Ciência Rural**, v. 47, n. 7, 2017.
- SANTOS, J. P. et al. Seroprevalence and risk factors for leptospirosis in goats in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. **Tropical animal health and production**, v. 44, n. 1, p. 101-106, 2012.
- SESSIONS, J. K.; GREENE, C. E. Canine Leptospirosis: Treatment, Prevention, and Zoonosis. **Compendium**, v. 26, n. 9, p. 700-706, 2004.
- SHEARER, K. E. et al. Detection of *Leptospira* spp. in wildlife reservoir hosts in Ontario through comparison of immunohistochemical and polymerase chain reaction genotyping methods. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 55, n. 3, p. 240, 2014.
- SILVA, E. F. et al. Isolation of *Leptospira noguchii* from sheep. **Veterinary microbiology**, v. 121, n. 1, p. 144-149, 2007.
- SMYTHE, L. D. et al. A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. **Bmc Infect Dis**, v. 2, n. 1, p. 13-21, 2002.

SOTO, F. R. M. et al. LEPTOSPIROSE SUÍNA. **Arq. Inst. Biol**, São Paulo, v. 74, n. 4, p.379-395, 2007.

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.

TOCHETTO, C. et al. Aspectos anatomopatológicos da leptospirose em cães: 53 casos (1965-2011). **Pesq. Vet. Bras.**, v. 32, n. 5, p. 430-443, 2012.

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.

WONG, S. J. et al. A multiplex microsphere immunoassay for Zika Virus diagnosis. **EBioMedicine**, v. 16, p. 136-140, 2017.

WYNWOOD, S. J. et al. Leptospirosis in Tasmanian Devils (*Sarcophilus harrisii*) in Tasmania, 2008–12. **Journal of wildlife diseases**, v. 52, n. 3, p. 636-641, 2016a.

WYNWOOD, S. J. et al. Serological diagnosis of Leptospirosis in bovine serum samples using a microsphere immunoassay. **Veterinary record open**, v. 3, n. 1, p. e000148, 2016b.

WYNWOOD, S. J. et al. Validation of a microsphere immunoassay for serological leptospirosis diagnosis in human serum by comparison to the current gold standard. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 3, p. e0003636, 2015.

XIA, H. et al. A microsphere-based immunoassay for rapid and sensitive detection of bovine viral diarrhoea virus antibodies. **Journal of virological methods**, v. 168, n. 1, p. 18-21, 2010.