



Universidade Federal
de Campina Grande

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL

CAMPUS DE PATOS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**ESTUDO SOROLÓGICO E MOLECULAR DA INFECÇÃO POR
LEPTOSPIRA spp. EM PEQUENOS RUMINANTES NO SEMIÁRIDO
NORDESTINO, BRASIL.**

**Dissertação do Programa de Pós-Graduação
em Medicina Veterinária do Centro de Saúde
e Tecnologia Rural da Universidade Federal
de Campina Grande, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre
em Medicina Veterinária.**

DIEGO FIGUEIREDO DA COSTA

PATOS-PB

10/03/2015



Universidade Federal
de Campina Grande

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26

CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL

CAMPUS DE PATOS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**ESTUDO SOROLÓGICO E MOLECULAR DA INFECÇÃO POR
LEPTOSPIRA spp. EM PEQUENOS RUMINANTES NO SEMIÁRIDO
NORDESTINO, BRASIL.**

**Dissertação do Programa de Pós-Graduação
em Medicina Veterinária do Centro de Saúde
e Tecnologia Rural da Universidade Federal
de Campina Grande, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre
em Medicina Veterinária.**

DIEGO FIGUEIREDO DA COSTA

Orientador: Prof. Dr. Clebert José Alves

PATOS-PB

10/03/2015

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSRT DA UFCG

C837e Costa, Diego Figueiredo da

Estudo sorológico e molecular da infecção por *Leptospira spp.* em pequenos ruminantes no semiárido nordestino, Brasil. / Diego Figueiredo da Costa. – Patos, 2015.

66f. : il.

Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2015.

"Orientação: Prof. Dr. Clebert José Alves"

"Coorientação: Prof. Dr. Sergio Santos Azevedo"

Referências.

1. Leptospirose. 2. Pequenos ruminantes. 3. Matadouro. 4. Sorologia.
5. PCR. 6. Resistentes. I. Título.

CDU 614.91

11

1 **DIEGO FIGUEIREDO DA COSTA**

2

3 **ESTUDO SOROLÓGICO E MOLECULAR DA INFECÇÃO POR**
4 ***LEPTOSPIRA* spp. EM PEQUENOS RUMINANTES NO SEMIÁRIDO**
5 **NORDESTINO, BRASIL.**

6

7

8

9

FICHA DE AVALIAÇÃO

10

11

12 Aprovada em: __/__/__

13

14

15

Comissão Examinadora:

16

17

18

Prof. Dr. Clebert José Alves

19

Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária/CSTR/UFCG

20

21

22

23

Prof. Dr. Sidnei Miyoshi Sakamoto

24

Departamento de Ciências Animais - UFERSA

25

26

27

Dr. Severino Silvano dos Santos Higinio

28

Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária/CSTR/UFCG

29

1 **AGRADECIMENTOS**

2

3 Agradeço a DEUS pelo dom da vida, sabedoria e saúde. Por sempre guiar meus passos
4 e colocar em minha vida esposa, família, colegas de trabalho e amigos tão especiais.

5 A minha esposa Emannelly pela compreensão, cumplicidade e amor compartilhado
6 hoje e sempre, você foi essencial nessa conquista, Te Amo. Agradeço a minha família, meu
7 pai (Ivan) e minha mãe (Diene), por seu amor incondicional, dedicação e apoio sem medir
8 esforços para que conquistasse meus objetivos, vocês são meus verdadeiros heróis. A minha
9 irmã (Ianny), pela preocupação diária, confiança, amor fraternal e toda força dada a cada
10 desafio e obstáculo encontrado, suas palavras foram fundamentais e me ajudaram bastante.
11 Amo todos vocês e dedico essa dissertação!

12 Ao meu orientador prof. Clebert José Alves, profissional sério e humanitário que a
13 cada dia admiro mais. Obrigado pelos ensinamentos, exemplos dados, experiência,
14 oportunidades oferecidas e por desempenhar seu papel de orientador com tanta eficácia.

15 Ao prof. Sérgio Santos de Azevedo, pela atenção, compromisso e conhecimentos
16 compartilhados ao longo de toda minha vida acadêmica.

17 Aos meus amigos/equipe de trabalho, Fabrine Santos, Aline Silva, Silvano Hígino,
18 Arthur Brasil, Érico, Areano Ethério, Devedê e Dona Francinete, fundamentais na execução
19 desta pesquisa, obrigado por todo empenho e compromisso.

20 Ao prof. Walter Lilenbaum, Ana Loureiro, Gabriel Martins, Fabiana Miraglia, Rafaela
21 e Lorena, por terem sido fundamentais na conclusão do trabalho e me recebido tão bem no
22 Laboratório de Bacteriologia Veterinária-UFF. Meu muito obrigado a todos!

23

RESUMO

A leptospirose é uma doença infecciosa e contagiosa causada por bactérias do gênero *Leptospira* spp. amplamente difundida no Brasil. Os pequenos ruminantes são suscetíveis à infecção gerando perdas econômicas, uma vez que determina falhas reprodutivas desses animais, bem como problemas de saúde pública, pois se trata de uma importante zoonose. O objetivo do trabalho foi detectar DNA de *Leptospira* spp., determinar a frequência de anticorpos específicos e proceder ao isolamento do agente em caprinos e ovinos abatidos em diferentes matadouros no Estado da Paraíba, semiárido do Nordeste brasileiro. Foram utilizados 1049 animais, oriundos de 19 matadouros municipais, sendo 500 caprinos e 549 ovinos. Para verificar a presença de anticorpos anti-*Leptospira* spp. foi utilizado o teste soroaaglutinação microscópica (SAM), utilizando-se 24 sorovares como antígenos e ponto de corte 1:100. Amostras de rins e urina foram utilizadas para detecção molecular (PCR) e cultivo bacteriológico de leptospirosas em 49 ovelhas deslanadas. A frequência de animais soropositivos para leptospirose nas 49 ovelhas deslanadas foi de 8,2% (4/49). Já o número de animais sororreagentes dentre os 1000 caprinos e ovinos analisados foi de 82 (8,2% IC95%= 7,0-10,5%), em que 26/500 (5,2%; IC95%=3,5-7,5%) eram caprinos e 56/500 (11,2%; IC95% 8,7-14,2%) ovinos. Os sorovares mais frequentes nos 1000 animais estudados foram Hardjobovis (14,6%) e Autumnalis (13,4%). Na PCR de tecido renal três animais foram positivos, enquanto que na de urina não foi detectado nenhum animal positivo. O cultivo foi negativo para todas as amostras. Conclui-se que ovinos e caprinos da região semiárida do Nordeste podem estar adaptados aos sorovares Hardjobovis e Autumnalis, bem como roedores silvestres podem estar envolvidos na transmissão da doença. Sugere-se a hipótese de que a rusticidade dos pequenos ruminantes na região estudada contribuiu para a baixa sororreatividade verificada, podendo ser estes resistentes a infecção. A PCR se mostrou uma importante ferramenta na detecção de animais portadores de leptospirosas, demonstrando ser uma técnica bastante sensível mesmo em animais negativos.

Palavras-chave: Leptospirose; pequenos ruminantes; matadouro; sorologia; PCR; resistentes.

ABSTRACT

The leptospirosis is an infectious and contagious disease caused by bacteria of the genus *Leptospira* spp. widespread in Brazil. Small ruminants are susceptible to infection generating economic losses as it determines reproductive failures in these animals, as well as problems in public health as it is an important zoonosis. The aim of this work was to detect *Leptospira* spp. DNA, determine the frequency of specific antibodies and proceed to the isolation of the agent in goats and sheep slaughtered in different slaughterhouses in the State of Paraíba, in the semi-arid region of the Brazilian Northeast. 1049 animals were used originated from 19 municipal slaughterhouses, being 500 goats and 549 sheep. To verify the presence of anti-*Leptospira* spp antibodies the microscopic agglutination test (MAT) was used, using 24 serovars as antigens and the cut-off point 1:100. Samples of kidneys and urine were used for the molecular detection (PCR) and bacteriological cultivation of leptospires in 49 woolless sheep. The frequency of seropositive animals for leptospirosis in the 49 woolless sheep was of 8.2% (4/49). The number of sero-reactive animals among the 1000 analyzed goats and sheep was 82 (8.2% IC 95% = 7.0-10.5%), in which 26/500 (5.2% ; IC95% = 3.5-7.5%) were goats and 56/500 (11.2%; IC95% 8.7-14.2%) sheep. The most frequent serovars in the 1000 animals studied were Harjjobovis (14.6%) and Autumnalis (13.4%). In the PCR of the renal tissues three animals were positive, whilst in the urine was not detected any positive animal. The cultivation was negative for all the samples. It is concluded that sheep and goats of the semi-arid region of the Northeast may have become adapted to the sorovars Harjjobovis and Autumnalis, as well as wild rodents may be involved in the transmission of the disease. It is suggested the hypothesis that the rusticity of the small ruminants in the studied region contributed to the low sero-reactivity verified, and these may be resistant to infection. The PCR revealed to be an important tool in the detection of animals carriers of leptospires, demonstrating to be a highly sensitive technique even in negative animals.

Keywords: Leptospirosis; Small ruminants; slaughterhouse; Serology; PCR; Resistant.

SUMÁRIO

1		
2	INTRODUÇÃO GERAL	9
3	REFERÊNCIAS	10
4	CAPITULO I.....	11
5	Levantamento sorológico e molecular da infecção por <i>Leptospira</i> spp. em ovinos deslanados	
6	abatidos na região semiárida do Nordeste, Brasil	11
7	INTRODUÇÃO.....	13
8	MATERIAL E MÉTODOS.....	14
9	Desenho do estudo:	14
10	Colheita de amostras	14
11	Cultivo bacteriano:.....	15
12	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR):.....	15
13	Teste Sorológico:	16
14	RESULTADOS	16
15	DISCUSSÃO	16
16	CONCLUSÃO.....	17
17	REFERÊNCIAS	18
18	CAPITULO II	23
19	Estudo sorológico da infecção por <i>Leptospira</i> spp. em caprinos e ovinos abatidos no Estado	
20	da Paraíba, semiárido do Nordeste, Brasil	23
21	INTRODUÇÃO.....	25
22	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
23	Desenho do estudo	27
24	Colheita de amostras	27
25	Teste sorológico	27
26	Análise estatística.....	28
27	RESULTADOS	28
28	DISCUSSÃO	28
29	CONCLUSÃO.....	32
30	REFERÊNCIAS	32
31	CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
32	ANEXO I.....	42
33	ANEXO II	53
34	ANEXO III.....	57

1
2 **LISTA DE TABELAS E QUADROS**

3
4 **CAPÍTULO I**

5
6 **Quadro 1. Resultados da sorologia, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e cultura**
7 **bacteriana, de acordo com a origem dos**
8 **animais.....21**

9
10 **CAPÍTULO II**

11
12 **Tabela 1.** Frequência de soropositivos para *Leptospira* spp., segundo município de origem e
13 índice pluviométrico anual em caprinos e ovinos submetidos ao abate no Estado da Paraíba,
14 Nordeste do Brasil, no período de abril a dezembro de
15 2012.....39

16
17 **Tabela 2.** Sorovares de *Leptospira* spp. mais prevalentes em caprinos com respectivos títulos
18 em matadouros do Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil, no período de abril a dezembro de
19 2012.....40

20
21 **Tabela 3.** Sorovares de *Leptospira* spp. mais prevalentes em ovinos com respectivos títulos
22 em matadouros do Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil, no período de abril a dezembro de
23 2012.....40

24

LISTA DE FIGURAS

1	
2	
3	CAPÍTULO I
4	
5	Fig. 1. Cidades de origem dos animais amostrados, segundo pluviometria nos anos de 2013 e
6	2014.....21
7	
8	Fig. 2. Eletroforese em agarose do DNA amplificado de amostras de Urina (U) e Tecido
9	Renal (TR) usando o iniciador <i>LipL32</i> com Ladder (LD) de 242pb (pares de base) e
10	respectivos controles negativo (CN) e positivo
11	(CP).....21
12	
13	CAPÍTULO II
14	
15	Figura 1. Representação geográfica das cidades que tiveram matadouros amostrados no
16	Estado da Paraíba, semiárido do Nordeste brasileiro, no período de abril a dezembro de
17	2012.....39

INTRODUÇÃO GERAL

1
2
3 A exploração da caprinovinocultura como atividade econômica tem se mostrando cada
4 vez mais relevante, estabelecendo-se como uma alternativa economicamente viável para
5 produtores rurais em diversas regiões do país, especialmente a região Nordeste (DA HORA et
6 al., 2013). O Brasil conta hoje com um efetivo de aproximadamente 9.384.894 de caprinos e
7 17.662.201 de ovinos, dos quais a região Nordeste detém cerca de 90% (8.538.255) e 57%
8 (10.110.352) desses efetivos, respectivamente (IBGE, 2011).

9 Devido à baixa tecnificação aplicada à produção, as enfermidades infecciosas ganham
10 destaque com relação à queda de produtividade (MARTINS et al., 2012). Dentre estas, a
11 leptospirose é relevante, visto ser amplamente disseminada e determinar abortamentos,
12 nascimento de crias fracas e prematuras, além de queda na produção de leite (ELLIS, 2015).
13 Tendo em vista que a infecção em pequenos ruminantes muitas vezes é subclínica e com
14 sintomas inespecíficos (MARTINS; LILENBAUM, 2014), o matadouro se torna uma
15 importante ferramenta para vigilância da leptospirose, na medida em que há necessidade de se
16 conhecer os sorovares presentes em cada região e compreender melhor a epidemiologia da
17 doença (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; GIANGASPERO et al., 2013).

18 A presente dissertação é composta por dois capítulos. O primeiro capítulo por um
19 artigo cujo objetivo foi detectar DNA leptospirico, determinar a frequência de aglutininas
20 anti-*Leptospira* e proceder ao isolamento do agente em ovelhas deslanadas abatidas no
21 semiárido do Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil, este foi submetido à revista Pesquisa
22 Veterinária Brasileira. O segundo capítulo é composto por artigo que teve como objetivo
23 detectar anticorpos anti-*Leptospira* spp. a partir de ovinos e caprinos abatidos no Estado da
24 Paraíba, semiárido do Nordeste brasileiro, e foi submetido à Semina: Ciências Agrárias.

REFERÊNCIAS

ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary Microbiology*, Geneva, v. 140, p. 287–296, 2010.

DA HORA, P. C.; FREITAS, A. A. F.; PLUTARCO, F. F.; IPIRANGA, A. S. R. O efeito potencial da transferência de conhecimento de processos biotecnológicos na cadeia produtiva da caprinovinocultura. *Organizações Rurais & Agroindustriais*, Lavras, MG, v. 15, n. 1, p. 117-136, 2013.

ELLIS, W. A. Animal Leptospirosis. *Current Topics in Microbiology Immunology*, Berlin, v. 387, p. 99-137, 2015.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. *Leptospira and leptospirosis*. 2. ed. Melbourne: MediSci, 1999. 272p.

GIANGASPERO, M., BONFINI, B., ORUSA, R., SAVINI, G., OSAWA, T.; HARASAWA, R. Epidemiological survey for *Toxoplasma gondii*, *Chlamydia psittaci* var. *ovis*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Coxiella burnetii*, *Brucella* spp., leptospirosis, and Orf Virus among sheep from northern districts of Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science*, Tokyo, v. 75, p. 679–684, 2013.

IBGE. Produção Pecuária Municipal. *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, BRASIL*. 2011. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2011/default_pdf.shtm> Acesso em: 14 dez. 2014.

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

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

CAPITULO I

**Levantamento sorológico e molecular da infecção por *Leptospira* spp. em ovinos
deslanados abatidos na região semiárida do Nordeste, Brasil**

Artigo submetido à Pesquisa Veterinária Brasileira
(Qualis A2)

1 **Levantamento sorológico e molecular da infecção por *Leptospira* spp. em ovinos**
 2 **deslanados abatidos na região semiárida do Nordeste, Brasil¹**

3
 4 Diego F. Costa², Aline F. Silva², Arthur W. L. Brasil², Ana P. P. Loureiro³, Fabrine A.
 5 Santos², Sergio S. Azevedo², Walter Lilenbaum³, Clebert J. Alves^{2*}

6
 7 **ABSTRACT.-** Costa D. F., Silva A. F., Loureiro A. P. P., Santos F. A., Azevedo S.
 8 S., Lilenbaum W. & Alves C. J. 2015. [**Serological and molecular survey of *Leptospira* spp.**
 9 **infection in sheep slaughtered in the semiarid region of Northeastern Brazil**]. Estudo
 10 sorológico e molecular da infecção por *Leptospira* spp. em ovinos abatidos no semiárido do
 11 Nordeste do Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Universidade Federal de
 12 Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Unidade Acadêmica de Medicina
 13 Veterinária, Av. Universitária s/n, Patos, PB 58700-970, Brazil. E-mail:
 14 clebertja@uol.com.br.

15 The diagnosis of leptospirosis in sheep herds still constitutes a challenge, as in production
 16 animals the infection is predominantly subclinical with unspecific symptoms. The aim of the
 17 present survey was to detect *Leptospira* spp. DNA, to determine the frequency of specific
 18 antibodies and proceed the isolation of the agent in sheep slaughtered in the county of Patos.
 19 semiarid region of the State of Paraíba, Northeastern Brazil. Forty-nine samples of blood and
 20 renal tissue as well as 25 urine samples from a total of 49 sheep were collected in the
 21 slaughter line. To verify the presence of anti-*Leptospira* spp. antibodies the microscopic
 22 agglutination test (MAT) was used. Samples of kidneys and urine were used for the molecular
 23 detection and bacteriological cultivation of leptospires. By MAT there was 8.16% (4/49) of
 24 seropositivity. In the PCR of renal tissue three samples were positive, however, all urine
 25 samples were negative, as well as all samples were negative at bacteriological cultivation. As
 26 the climate conditions of the study period allowed the transmissibility of the leptospirosis, it is
 27 suggested that the drought cannot be considered as the only factor responsible for the verified
 28 low seroreactivity. Thus, it is possible to suggest the hypothesis that, in addition to the
 29 environmental conditions, the rusticity of the mixed-bred sheep collaborated to the low

¹Received.....

Accepted for publication.....

² Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária (UAMV), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG),
 Av. Universitária s/n, Caixa Postal 61, Santa Cecília, Patos, PB 58700-970, Brasil.*Corresponding author:
clebertja@uol.com.br

³ Universidade Federal Fluminense (UFF), Instituto Biomédico, Departamento de Microbiologia e Parasitologia,
 Rua Professor Hernani Melo 101, Niterói, RJ 24210-130, Brasil.

1 seroreactivity. The PCR revealed to be an important tool in the detection of animals carriers
2 of leptospires, demonstrating to be a sensitive technique even in negative animals.

3
4 **RESUMO.-** O diagnóstico da leptospirose em rebanhos de ovelhas ainda constitui um
5 desafio, uma vez que animais de produção a infecção é predominantemente subclínica com
6 sintomas inespecíficos. O objetivo do presente trabalho foi detectar DNA de *Leptospira* spp.,
7 determinar a frequência de anticorpos específicos e proceder ao isolamento do agente em
8 ovelhas deslanadas abatidas no semiárido do estado da Paraíba, Nordeste do Brasil. Quarenta
9 e nove amostras de sangue e tecido renal, bem como 25 amostras de urina de um total de 49
10 ovelhas foram coletados na linha de abate. Para verificar a presença de anticorpos anti-
11 *Leptospira* spp. o teste de soroaglutinação microscópica (SAM) foi utilizado. Amostras de
12 rins e urina foram utilizadas para detecção molecular (PCR) e cultivo bacteriológico de
13 leptospiros. Pela SAM houve 8,2% (4/49) de soropositividade. No PCR de tecido renal três
14 amostras foram positivas, no entanto, todas as amostras de urina foram negativas, assim como
15 as amostras foram negativas na cultura bacteriológica. Como as condições climáticas do
16 período de estudo permitiam a transmissibilidade da leptospirose, sugere-se que a seca não
17 pode ser considerado como o único fator responsável pela baixa sororreatividade verificada.
18 Assim, é possível sugerir a hipótese de que, para além das condições ambientais, a rusticidade
19 das ovelhas de raças mestiças colaborou para baixa reatividade sérica. A PCR revelou ser uma
20 ferramenta importante na detecção de animais portadores de leptospiros, demonstrando ser
21 uma técnica sensível mesmo em animais negativos.

22
23 TERMOS DE INDEXACAO: Leptospirose, pequenos ruminantes, PCR, sorologia,
24 isolamento, Matadouro.

25 26 INTRODUÇÃO

27
28 A ovinocultura é uma atividade econômica de grande valor para a pecuária brasileira e
29 principalmente para a região Nordeste, situada em uma faixa abrangida por mais de 30% de
30 área semiárida (Girardi & Rosa 2011). Assim como em outros países em desenvolvimento, a
31 criação de ovinos no Brasil é importante na geração de renda e subsistência dos pequenos
32 agricultores familiares (Pugh & Baird 2012). Devido à baixa tecnificação aplicada à
33 produção, as enfermidades infecciosas ganham destaque com relação à queda de
34 produtividade (Martins et al. 2012). Dentre estas, a leptospirose é relevante, visto ser

1 amplamente disseminada e determinar abortamentos, nascimento de crias fracas e prematuras
2 além de queda na produção de leite (Ellis 2015). A ocorrência e amplitude da leptospirose nos
3 rebanhos estão estreitamente vinculadas a fatores ambientais como índice pluviométrico,
4 umidade, topografia, presença de roedores, animais silvestres e criações consorciadas (Alves
5 et al. 1996, Lilenbaum et al. 2008).

6 O diagnóstico da leptospirose em rebanhos ovinos ainda configura um desafio, já que
7 a infecção nessa espécie muitas vezes é subclínica e com sintomas inespecíficos (Faine et al.
8 1999, Martins & Lilenbaum 2014). O teste de soroaglutinação microscópica (SAM) é o teste
9 sorológico recomendado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE 2012). Para a
10 identificação de rebanhos infectados é recomendado o uso da soroaglutinação microscópica
11 (SAM) como teste de triagem, associado à PCR para detecção dos animais portadores no
12 rebanho (Martins & Lilenbaum 2014).

13 Já a detecção do DNA de *Leptospira* spp. pela Reação em Cadeia da Polimerase
14 (PCR) tem sido de grande utilidade e está cada vez mais se firmando na rotina laboratorial
15 para diagnóstico da leptospirose (Higino & Azevedo 2014). A sua principal vantagem é a alta
16 especificidade, porém exige aparelhagem específica, laboratorial e pessoal altamente treinado,
17 tornando-se restrita a poucos laboratórios de referência (Bourhy, Vray & Picardeau 2013).

18 O matadouro é considerado um excelente ambiente de vigilância para inúmeras
19 doenças infectocontagiosas, sendo o local na qual se consegue a maior recuperação de
20 leptospiras viáveis em animais. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi detectar DNA
21 leptospirico, determinar a frequência de aglutininas anti-*Leptospira* spp. e proceder ao
22 isolamento do agente em ovelhas deslanadas abatidas no semiárido do Estado da Paraíba,
23 Nordeste do Brasil.

24

25

MATERIAL E MÉTODOS

26

27 **Desenho do estudo:** O estudo foi conduzido em um matadouro municipal localizado na
28 cidade de Patos (Latitude: 07° 01' 28" S; Longitude: 37° 16' 48" W), mesorregião do Sertão do
29 estado da Paraíba, semiárido do Nordeste do Brasil. A população estudada era constituída de
30 ovinos deslanados adultos, todas fêmeas, destinadas ao abate e oriundos das cidades de Patos
31 e arredores (Fig. 1).

32

33 **Colheita de amostras:** No intuito de incluir tanto o período chuvoso quanto o de estiagem na
34 região, as colheitas foram realizadas entre os meses de outubro de 2013 a agosto de 2014.

1 Foram colhidas na linha de abate 49 amostras de sangue e tecido renal, bem como 25
2 amostras de urina, de um total de 49 ovelhas. As amostras de sangue foram colhidas pouco
3 antes da sangria dos animais, utilizando-se tubos a vácuo estéreis de 8 mL devidamente
4 identificados. Em seguida estes foram conduzidos ao laboratório, onde foram centrifugados e
5 as amostras de soro armazenadas a -20 °C até a realização da prova sorológica. Um rim de
6 cada animal foi colhido e, de forma asséptica no laboratório, uma porção de aproximadamente
7 5g foi congelada a -20 °C para extração de DNA. Outra porção de aproximadamente 1g
8 seguiu para o processamento bacteriológico. Com relação à urina, esta foi coletada por
9 cistocentese durante a evisceração, por meio de seringas estéreis. Imediatamente após a
10 colheita, 1 mL foi destinado ao processamento bacteriológico e alíquotas de 5mL foram
11 armazenadas a -20°C para extração de DNA genômico.

12
13 **Cultivo bacteriano:** As amostras de urina foram semeadas imediatamente após a colheita,
14 enquanto as amostras de rim foram primeiramente maceradas com o uso de seringas estéreis e
15 então foram inoculadas nos meios próprios. Para a tentativa de isolamento, primeiramente as
16 amostras foram semeadas em EMJH semissólido (Difco, BD, Franklin Lakes, NJ, USA),
17 enriquecido com os antibióticos anfotericina B (0,05 mg/mL), 5-fluorouracil (1mg/mL),
18 fosfomicina (4 mg/mL), trimetoprim (0,2 mg/mL), sulfametoxazol (0,4 mg/mL), de modo que
19 fornecessem concentração de 10% (Chakraborty et al. 2010). Após a inoculação os tubos
20 foram transportados ao laboratório em temperatura ambiente. Chegando ao laboratório, no
21 mesmo dia, os meios semeados foram submetidos à diluição seriada (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) em meio
22 semissólido Fletcher (Difco, BD, Franklin Lakes, NJ, USA) acrescido de 5-Fluorouracil
23 (1mg/mL). Após diluição, os tubos foram incubados em estufa bacteriológica com
24 temperatura entre 28 °C a 30 °C, e examinados em microscopia de campo escuro
25 semanalmente, durante seis semanas (Faine et al. 1999).

26
27 **Reação em Cadeia da Polimerase (PCR):** O procedimento da extração de DNA de
28 leptospiros foi realizado com o Kit Wizard® Genomic SV DNA Purification System
29 (Promega®, Madison, EUA). Foram utilizados *primers* *LipL32-45F* (5'-AAG CAT TAC TTG
30 CGC TGG TG-3') e *LipL32-286R* (5'-TTT CAG CCA GAA CTC CGA TT-3') desenhados
31 por Stoodard et al. (2009) que tem o gene *LipL32* como alvo, específico para leptospiros
32 patogênicos. Foi utilizada a metodologia anteriormente descrita por Hamond et al. (2014).
33 Foram utilizadas 10 fg de DNA extraído de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa
34 Fiocruz L1130 como controle positivo e água ultrapura como controle negativo.

1
2 **Teste Sorológico:** A presença de anticorpos anti-*Leptospira* spp. foi determinada pela SAM
3 (OIE, 2012), utilizando como antígenos uma coleção de cepas de *Leptospira biflexa* sorovares
4 Andamana e Patoc, *Leptospira interrogans*: Australis, Copenhageni, Bataviae, Bratislava,
5 Canicola, Grippotyphosa, Hardjoprajitno, Pomona, Pyrogenes, Icterohaemorrhagiae,
6 Hebdomadis, Wolffi, Butembo; *Leptospira borgpeterseni*: Autumnalis, Castellonis,
7 Hardjobovis Javanica, Tarassovi, *Leptospira santarosai*: Guaricura, Shermani; *Leptospira*
8 *kirschneri*: Cynopteri, e *Leptospira noguchii*: Panama cedidas pelo Laboratório de
9 Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal Fluminense (UFF) e oriundas do Instituto
10 Pasteur, França. Todas as amostras com atividade aglutinante na diluição de 1:100 foram
11 consideradas positivas. As amostras positivas foram tituladas de forma seriada na razão de
12 dois. O ponto de corte era o tubo de maior diluição que apresentasse 50% de aglutinações
13 quando comparado com o controle. O maior título alcançado foi usado para identificar o
14 sorovar infectante.

15

16

RESULTADOS

17

18 Quatro dos animais testados foram sororreativos (8,2%). O sorovar mais frequente foi
19 Javanica (75%) seguido por Autumnalis (25%), com títulos que variaram de 100 a 800,
20 demonstrados no Quadro 1. Não foram obtidas culturas de *Leptospira* spp. pura para nenhuma
21 das amostras. Com relação à detecção de DNA leptospírico, três amostras de rim
22 amplificaram o gene *LipL32* (3/49; 6,1%), enquanto não foi observada amplificação em
23 nenhuma amostra de urina (Fig. 2). Dentre as três ovelhas que amplificaram o DNA
24 leptospírico no tecido renal, duas eram sororreativas, ambas para o sorovar Javanica, com
25 títulos de 200 e 800. Os três animais positivos na PCR pertenciam ao mesmo rebanho.

26

27

DISCUSSÃO

28

29 A frequência de sororreativos identificada no presente estudo foi bastante inferior á
30 verificada em inquéritos sorológicos conduzidos em ovinos de outras regiões do Brasil:
31 34,3% no Rio Grande do Sul (Herrmann et al. 2004); 47,4% no Rio de Janeiro (Martins et al.
32 2012); 33,3% em Rondônia (Aguiar et al. 2010). Entretanto, foram bastante semelhantes aos
33 observados em estudos conduzidos na região do semiárido nordestino, que variaram entre
34 3,5% no Rio Grande do Norte (Azevedo et al. 2004) a 7,5% na Paraíba (Higino et al. 2010).

1 Esta extrema diferença observada entre as frequências de ovinos sororreativos entre a região
2 Nordeste quando comparada às demais regiões pode ser devido ao menor índice
3 pluviométrico no Nordeste, em especial na região estudada, que apresenta condições de clima
4 semiárido.

5 Considerando a dificuldade do isolamento, seu risco biológico e o longo período
6 necessário para sua realização, a PCR se mostra uma importante ferramenta na identificação
7 de portadores de leptospiros (Director et al. 2014). No presente estudo, a PCR se mostrou
8 mais eficaz na detecção do agente do que o cultivo bacteriano. Portanto, essa técnica cada vez
9 mais se firma no diagnóstico da leptospirose animal.

10 A importância da transmissão hídrica da leptospirose é bem estabelecida,
11 particularmente em regiões tropicais (Martins, Penna & Lilenbaun 2010). A região Nordeste
12 vem sofrendo com chuvas abaixo do esperado nos últimos três anos, entretanto de acordo com
13 o Quadro 2 se verifica que no ano de 2014 os índices pluviométricos atingiram cerca de 800
14 mm nas cidades estudadas (Aesa 2014, Ipa 2014), acima do mínimo estabelecido (500 a 550
15 mm) para a sobrevivência ambiental de leptospiros na região semiárida, bem como para os
16 mecanismos de disseminação da doença (Alves et al. 1996). Desta forma, embora
17 desempenhe um impacto na epidemiologia da infecção, a seca não pode ser considerada como
18 único fator responsável pela baixa sororreatividade que foi verificada em ovinos no presente
19 estudo.

20 Cabe destacar que apesar de bem estabelecida a relação entre a pluviosidade e
21 frequência de animais sororreativos (Alves et al. 1996, Vanasco et al. 2008), o mesmo
22 fenômeno não foi observado em bovinos da mesma região. Um recente estudo conduzido com
23 bovinos da mesma região relatou 61,1% de animais reativos (Pimenta et al. 2014).

24 A baixa reatividade encontrada no presente estudo pode ser associada a uma possível
25 diferença de susceptibilidade entre raças de ovinos. Alguns trabalhos evidenciaram a raça
26 como fator de risco para leptospirose em pequenos ruminantes, em que foi observada maior
27 susceptibilidade à infecção entre animais de raça pura do que em animais mestiços (Silva et
28 al. 2012, Santos et al. 2012). No semiárido do Nordeste do Brasil, mais de 90% do total do
29 plantel correspondem a ovinos de raças mestiças (Cezar et al. 2004). Assim sendo, é possível
30 sugerir a hipótese de que, além das condições ambientais, a rusticidade dos ovinos mestiços
31 estudados colabora para a baixa sororreatividade verificada no presente estudo.

32

33

CONCLUSÃO

34

1 A partir dos resultados encontrados, conclui-se que no período estudado a leptospirose
2 não foi frequente entre os ovinos na região semiárida do estado da Paraíba. Como as
3 condições climáticas do período do estudo permitiam a transmissibilidade da leptospirose,
4 sugere-se que a seca não pode ser considerada como único fator responsável pela baixa
5 sororreatividade verificada. Assim, é possível sugerir a hipótese que, além das condições
6 ambientais, a rusticidade dos ovinos mestiços estudados colabora para a baixa
7 sororreatividade verificada no presente estudo. A PCR se mostrou uma importante ferramenta
8 na detecção de animais portadores de leptospiras, mostrando ser uma técnica bastante sensível
9 mesmo em animais negativos.

11 REFERÊNCIAS

13 Aesa. 2014. Monitoramento Pluviométrico. Agência Executiva de Gestão das Águas do
14 Estado da Paraíba (AESA). Disponível em
15 <<http://site2.aesa.pb.gov.br/aesa/monitoramentoPluviometria.do?metodo=listarAnosChuvasAnuais>> Acesso 30 nov. 2014.

18 Aguiar D.M., Cavalcante G.T., Vasconcellos S.A., Souza G.O., Labruna M.B., Camargo
19 L.M.A. & Gennari S.M. 2010. Anticorpos anti-*Leptospira* spp. em ovinos do Município de
20 Monte Negro, Estado de Rondônia. Arq. Inst. Biol. 77(3):529-532.

22 Alves C.J., Vasconcellos S.A., Camargo C.R.A. & Moraes Z.M. 1996. Influência dos fatores
23 ambientais sobre a proporção de caprinos soro-reatores para a leptospirose em cinco
24 centros de criação do Estado da Paraíba, Brasil. Arq. Inst. Biol. 63(2):11-19.

26 Alves C.J., Alcindo J.F., Farias A.E.M., Higino S.S.S., Santos F.A., Azevedo S.S., Costa D.F.
27 & Santos C.S.A.B. 2012. Caracterização epidemiológica e fatores de risco associados à
28 leptospirose em ovinos deslanados do semiárido Brasileiro. Pesq. Vet. Bras. 32(6):523-
29 528.

31 Azevedo S.S., Alves C.J., Andrade J.S.L., Batista C.S.A., Clementino I.J. & Santos F.A.
32 2004. Ocorrência de aglutininas anti-*Leptospira* em ovinos do Estado do Rio Grande do
33 Norte, Brasil. Rev. Bras. Ciênc. Vet. 11(3):167-170.

- 1 Bourhy P., Vray M. & Picardeau M. 2013. Evaluation of an in-house ELISA using the
2 intermediate species *Leptospira fainei* for diagnosis of leptospirosis. J. Med. Microbiol.
3 62:822–827.
4
- 5 Cezar M.F., Souza B.B., Souza W.H., Pimenta-Filho E.C., Tavares G.P. & Medeiros G.X.
6 2004. Avaliação de parâmetros fisiológicos de ovinos Dorper, Santa Inês e seus mestiços
7 perante condições climáticas do trópico Semi-Árido nordestino. Ciênc. Agrotec. 28(3):614-
8 634.
9
- 10 Chakraborty A., Miyahara S., Villanueva S.Y.A.M., Gloriani N.G. & Yoshida S. 2010. *In*
11 *Vitro* Sensitivity and Resistance of 46 *Leptospira* Strains Isolated from Rats in the
12 Philippines to 14 Antimicrobial Agents. Antimicrob. Agents Chemother. 54(12):5403–
13 5405.
- 14 Director A., Martins G.M.S., Loureiro A.P.P., Hamond C.R.M.R., Medeiros M.A. &
15 Lilenbaum W. 2014. Molecular detection of leptospiral carriers in sheep under tropical
16 field conditions. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 51(3):220-223.
17
- 18 Ellis W. A. 2015. Animal Leptospirosis. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 387:99-137.
19
- 20 Faine S., Adler B., Bolin C. & Perolat P. 1999. *Leptospira and leptospirosis*. 2nd ed. MediSci,
21 Melbourne. 272p.
22
- 23 Girardi G. & Rosa J.V. 2011. *Atlas geográfico do estudante*. Editora FDT S. A., São Paulo.
24 160p.
25
- 26 Hamond C., Martins G., Loureiro A.P., Pestana C., Lawson-Ferreira R., Medeiros M.A. &
27 Lilenbaum W. 2014. Urinary PCR as an increasingly useful tool for an accurate diagnosis
28 of leptospirosis in livestock. Vet. Res. Commun. 38:81–85.
29
- 30 Herrmann G.P., Lage A.P. & Moreira E.C. 2004. Soroprevalência de aglutininas anti-
31 *Leptospiraspp.* em ovinos nas Mesorregiões Sudeste e Sudoeste do Estado Rio Grande do
32 Sul, Brasil. Cienc. Rural. 34(2):443-448.
33

- 1 Higino S.S.S., Azevedo S.S., Alves C.J., Figueiredo S.M., Silva M.L. C.R. & Batista C.S.A.
2 2010. Frequência de leptospirose em ovinos abatidos no Município de Patos, Paraíba. Arq.
3 Inst. Biol. 77(3):525-527.
4
- 5 Higino S.S.S. & Azevedo S.S. 2014. Leptospirose em pequenos ruminantes: situação
6 epidemiológica atual no Brasil. Arq. Inst. Biol. 81(1):86-94.
7
- 8 Ipa. 2014. Sessão de Índices Pluviométricos. Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA).
9 Disponível em<http://www.ipa.br/indice_pluv.php> Acesso 02 dez. 2014.
10
- 11 Lilenbaum W., Vargas R., Medeiros L., Cordeiro A.G., Cavalcanti A., Souza G.N.,
12 Richtzenhain L. & Vasconcellos S.A. 2008. Risk factors associated with leptospirosis in
13 dairy goats under tropical conditions in Brazil. Res. Vet. Sci. 84:14–21.
14
- 15 Martins G., Penna B. & Lilenbaum W. 2010. Maintenance of *Leptospira* infection in cattle
16 under tropical conditions. Vet. Rec. 167:629–630.
17
- 18 Martins G., Penna B., Hamond C., Leite R.C., Silva A., Ferreira A., Brandão F., Oliveira F. &
19 Lilenbaum W. 2012. Leptospirosis as the most frequent infectious disease impairing
20 productivity in small ruminants in Rio de Janeiro, Brazil. Trop. Anim. Health Prod.
21 44(4):773-777.
22
- 23 Martins G. & Lilenbaum W. 2014. Leptospirosis in sheep and goats under tropical conditions.
24 Trop. Anim. Health Prod. 46:11–17.
25
- 26 OIE. 2012. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 6th ed. Paris:
27 World Organization for Animal Health. 1343p.
28
- 29 Pimenta C.L.R.M., Castro V., Clementino I.J., Alves C.J., Fernandes L.G., Brasil A.W.L.,
30 Santos C.S.A.B. & Azevedo S.S. 2014. Leptospirose bovina no Estado da Paraíba:
31 prevalência e fatores de risco associados à ocorrência de propriedades positivas. Pesq. Vet.
32 Bras. 34(4):332-336.
33

- 1 Pugh D.G. & Baird A.N. 2012. *Sheep and goat medicine*. 2nd ed., Saunders, Maryland
 2 Heights. 621p.
 3
- 4 Santos J.P., Lima-Ribeiro A.M., Oliveira P.R., Santos M.P., Ferreira A.Jr., Medeiros A.A.
 5 & Tavares T.C. 2012. Seroprevalence and risk factors for Leptospirosis in goats in
 6 Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. *Trop. Anim. Health Prod.* 44:101-106.
 7
- 8 Silva R.C., Costa V.M., Shimabukuro F.H., Richini-Pereira V.B., Menozzi B.D. & Langoni
 9 H. 2012. Frequency of *Leptospira* spp. in sheep from Brazilian slaughterhouses and its
 10 association with epidemiological variables. *Pesq. Vet. Bras.* 32(3):194-198.
 11
- 12 Stoddard R.A., Gee J.E., Wilkins P.P., Mccaustland K. & Hoffmaster A.R. 2009. Detection of
 13 pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the
 14 *LipL32* gene. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 64:247–255.
 15
- 16 Vanasco N.B., Schmeling M.F., Lotterberger J., Costa F., Ko A.I. & Tarabla H.D. 2008.
 17 Clinical characteristics and risk factors of human leptospirosis in Argentina (1999-2005).
 18 *Acta Trop.* 107:255-258.

19 20 **Legendas das Figuras**

21
22 Fig. 1. Representação das cidades com respectivo número de animais amostrados no
 23 semiárido nordestino brasileiro no período de outubro de 2013 a agosto de 2014.
 24

25 Fig. 2. Eletroforese em agarose do DNA amplificado de amostras de Urina (U) e Tecido
 26 Renal (TR) usando o iniciador *LipL32* com Ladder (LD) de 242pb (pares de base) e
 27 respectivos controles negativo (CN) e positivo (CP).
 28

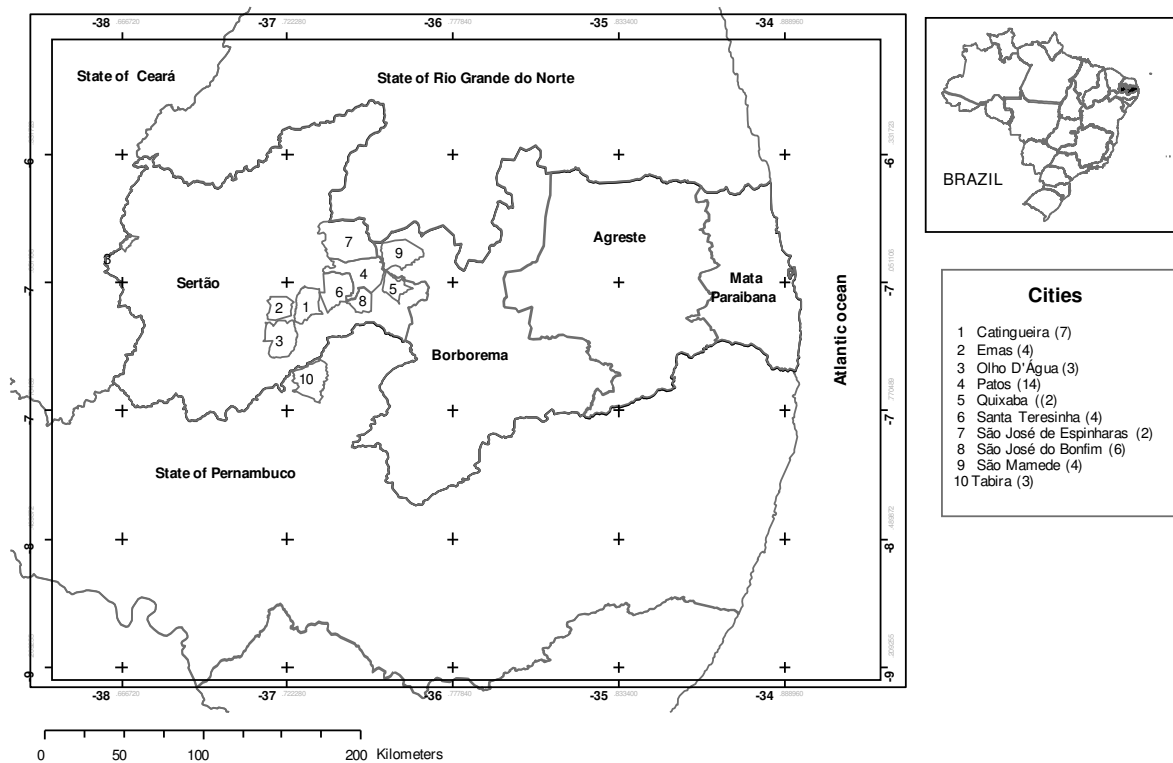
29 **Os Quadros**

30
31 **Quadro 1. Resultados da sorologia, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e cultura**
 32 **bacteriana, de acordo com a origem dos animais**

Origem	Sorologia		Molecular e Cultura	
	Sorovar	Título	PCR	Isolamento
Patos	Autumnalis	100	-	-

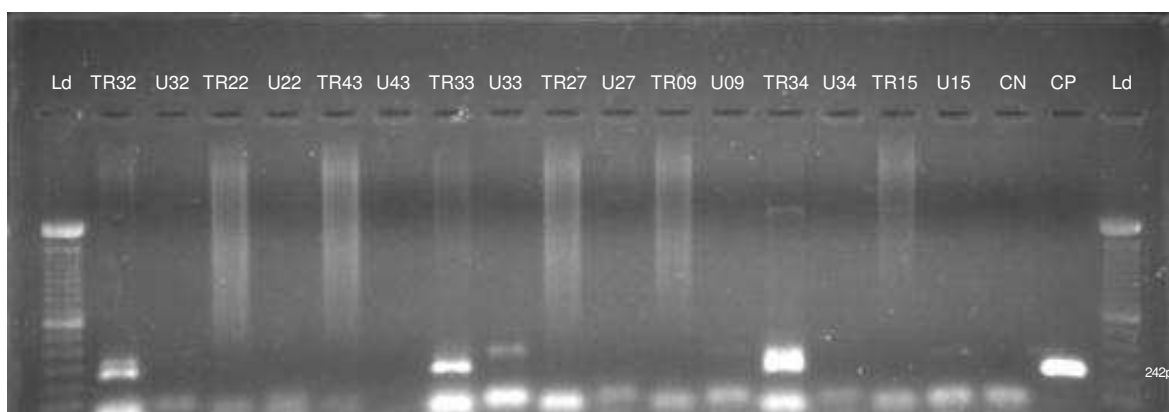
São Mamede	Javanica	100	-	-
Tabira	Javanica	800	+	-
Tabira	Javanica	200	+	-
Tabira	-	-	+	-

1
2



3
4
5

Figura 1



6
7
8

Figura 2

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19

CAPITULO II

**Estudo sorológico da infecção por *Leptospira* spp. em caprinos e ovinos abatidos no
Estado da Paraíba, semiárido do Nordeste, Brasil**

Artigo submetido à revista Semina: Ciências Agrárias
(Qualis B1)

1 **Estudo sorológico da infecção por *Leptospira* spp. em caprinos e ovinos abatidos no**
2 **Estado da Paraíba, semiárido do Nordeste, Brasil**

3
4 **Serological study of the infection by *Leptospira* spp. in sheep and goats slaughtered in**
5 **the State of Paraíba, semiarid of Northeastern Brazil**

6
7 Diego Figueiredo da Costa¹; Aline Ferreira da Silva¹; Areano Ethério Moreira Farias¹; Arthur
8 Willian de Lima Brasil¹; Fabrine Alexandre dos Santos¹; Ricardo de Figueiredo Guilherme¹;
9 Sergio Santos de Azevedo¹; Clebert José Alves¹.

10
11 **Resumo**

12 O objetivo do presente estudo foi determinar a frequência de anticorpos anti-*Leptospira* spp.
13 em caprinos e ovinos abatidos em diferentes matadouros no Estado da Paraíba, região
14 semiárida do Nordeste brasileiro. Foi coletado sangue de 500 caprinos e 500 ovinos de ambos
15 os sexos e aleatoriamente selecionados. Para verificar a presença de anticorpos anti-
16 *Leptospira* spp. o teste soroaglutinação microscópica (SAM) foi utilizado, utilizando-se 24
17 sorovares como antígenos. Dos 1.000 animais analisados 82 (8,2% IC95%= 7,0-10,5%) foram
18 sororreagentes, sendo 26/500 (5,2%; IC95%=3,5-7,5%) em caprinos e 56/500 (11,2%; IC95%
19 8,7-14,2%) em ovinos. Os sorovares mais frequentes nas espécies estudadas foram
20 Hardjobovis (14,6%) e Autumnalis (13,4%). Na espécie caprina o sorovar mais frequente foi
21 o Hardjobovis, e na espécie ovina o Ballum, com frequências de 19,2% e 17,9%,
22 respectivamente. Houve diferença significativa na frequência de positivos entre os
23 matadouros, tanto para caprinos (p = 0,035) quanto para ovinos (p = 0,004), com o município
24 de Alhandra apresentando a maior frequência de soropositivos para ambas as espécies.
25 Conclui-se que ovinos e caprinos da região semiárida do Nordeste podem estar adaptados aos
26 sorovares Hardjobovis e Autumnalis, bem como roedores silvestres estarem envolvidos na
27 transmissão da doença. Possivelmente as condições climáticas influenciaram na
28 transmissibilidade da leptospirose, especialmente na mesorregião da Mata Paraibana,
29 entretanto não foi considerada suficiente para justificar a ocorrência de baixos títulos de
30 anticorpos verificada nos animais. Deste modo, é possível sugerir a hipótese de que a

¹Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR), av. universitária s/n, bairro Santa Cecília, Patos, PB, 58700-970, Brasil.

*Autor para correspondência: clebertja@uol.com.br

1 rusticidade dos pequenos ruminantes na região estudada contribui para a baixa
2 sororreatividade verificada.

3

4 **Palavras-chave:** Adaptabilidade; Caprinos; Leptospirose; Ovinos; Rusticidade.

5

6

Abstract

7 The aim of the present work was to determine the frequency of anti-*Leptospira* spp.
8 antibodies in goats and sheep slaughtered in different slaughterhouses in the State of Paraíba,
9 in the semi-arid region of the Brazilian Northeast. The blood of randomly selected 500 goats
10 and 500 sheep of both genders was collected. To verify the presence of anti-*Leptospira* spp.
11 antibodies the microscopic agglutination test (MAT) was used, using 24 serovars as antigens.
12 From the 1.000 animals analyzed, 82 (8.2% IC95%= 7.0-10.5%) were sero-reactive being
13 26/500 (5.2%; IC95%=3.5-7.5%) in goats and 56/500 (11.2%; IC95% 8.7-14.2%) in sheep.
14 The most frequent serovars in the studied species were Hardjobovis (14.6%) and Autumnalis
15 (13.4%). In goats, the most frequent serovar was the Hardjobovis, and in sheep the Ballum,
16 with frequencies of 19.2% and 17.9%, respectively. There was a significant difference in the
17 frequency of positive animals between the slaughterhouses, both for goats ($p = 0.035$) and for
18 sheep ($p = 0.004$), with the municipality of Alhandra presenting the highest frequency of
19 seropositive animals for both species. It is concluded that sheep and goats of the semi-arid
20 region of the Northeast may have become adapted to the serovars Hardjobovis e Autumnalis,
21 as well as wild rodents may be involved in the transmission of the disease. It is possible that
22 the climatic conditions influenced in the transmissibility of the leptospirosis, especially in the
23 Mata Paraibana mesoregion, however it was not considered as being sufficient to justify the
24 occurrence of low titles of antibodies verified in the animals. In this way, it is possible to
25 suggest the hypothesis that the rusticity of the small ruminants in the studied region
26 contributed to the low sero-reactivity verified.

27

28 **Keywords:** Adaptability; Goats; Leptospirosis; Sheep; Rusticity.

29

Introdução

30

31
32 A exploração da caprinovinocultura como atividade econômica tem se mostrando
33 cada vez mais relevante, estabelecendo-se como uma alternativa economicamente viável para
34 produtores rurais em diversas regiões do país, especialmente na região Nordeste (DA HORA

1 et al., 2013). O Brasil conta hoje com um efetivo de aproximadamente 9.384.894 de caprinos
2 e 17.662.201 de ovinos, dos quais a região Nordeste detém cerca de 90% (8.538.255) e 57%
3 (10.110.352) desses efetivos, respectivamente (IBGE, 2011). Contudo, deficiências sanitárias
4 que causam perdas reprodutivas associadas à reposição de animais nessas espécies necessitam
5 de resolução (ESCÓCIO, 2009). Dentre estas, a leptospirose é relevante, visto ser amplamente
6 disseminada e determinar abortamentos, nascimento de crias fracas e prematuras, além de
7 queda na produção de leite (ELLIS, 2015).

8 A leptospirose é uma zoonose cosmopolita causada por espiroquetas patogênicas
9 pertencentes ao gênero *Leptospira* spp. (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).
10 Zoonose mundialmente distribuída, sua presença estar vinculada a fatores ambientais, com
11 sua incidência tendo forte associação com períodos de alta pluviosidade (ALVES et al., 1996;
12 LILENBAUM et al., 2008). Em condições favoráveis e na presença de hospedeiros
13 adequados, as leptospiras podem persistir por semanas a meses no ambiente (FAINE et al.,
14 1999). A transmissão da leptospirose ocorre, principalmente, pela exposição à água ou solo
15 contaminado, contato direto ou com a urina de animais infectados (ADLER; DE LA PEÑA
16 MOCTEZUMA, 2010).

17 A infecção por *Leptospira* spp. tem sido determinada por estirpes adaptadas ao
18 hospedeiro e não adaptadas (incidentais). Quando um sorovar estiver adaptado, predomina-se
19 a forma crônica da doença, onde abortamentos, natimorfos, nascimento de crias fracas e altas
20 taxas de mortalidade nos primeiros dias de vida são frequentes (GERRITSEN et al., 1994).
21 Quando a forma incidental da doença ocorre, predomina-se a doença aguda, que em pequenos
22 ruminantes a febre, anorexia, depressão, icterícia, síndromes hemorrágicas e anêmicas são os
23 sinais mais percebidos (MARTINS et al., 2012).

24 A identificação de leptospiras pode ser confirmada por diferentes métodos, sejam
25 clínicos e laboratoriais (FAINE et al., 1999). Em pequenos ruminantes, como os sintomas são
26 pouco evidentes ou até mesmo ausentes o diagnóstico se baseia essencialmente em testes
27 laboratoriais (FAINE et al., 1999; MARTINS; LILENBAUM, 2014). O teste de
28 soroaglutinação microscópica (SAM) é o teste sorológico recomendado pela Organização
29 Mundial de Saúde Animal (OIE, 2012), sua principal vantagem é a alta especificidade, porém
30 exige aparelhagem específica, laboratorial e pessoal altamente treinado, tornando-se restrita a
31 poucos laboratórios de referência (BOURHY et al., 2013).

32 Os sorovares que causam leptospirose, apesar de distintas variações e diferentes
33 hospedeiros de manutenção, geralmente ocorrem em regiões e espécies com as quais estejam
34 mais adaptados, tornando-se necessário o conhecimento desses sorovares e seus hospedeiros

1 de manutenção para compreender melhor a epidemiologia da doença (ADLER; DE LA PEÑA
2 MOCTEZUMA, 2010; GIANGASPERO et al., 2013). O matadouro tem um importante papel
3 no estudo das doenças infectocontagiosas, especialmente a leptospirose, uma vez que é o local
4 onde são recuperados os maiores números de leptospiras viáveis em animais, constituindo um
5 ambiente estratégico para vigilância ativa na identificação/origem de possíveis focos da
6 doença. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi detectar anticorpos anti-*Leptospira*
7 spp. a partir de ovinos e caprinos abatidos no Estado da Paraíba, semiárido do Nordeste
8 brasileiro.

9

10 **Material e Métodos**

11

12 *Desenho do estudo:* O estudo foi conduzido em 10 matadouros municipais do Estado da
13 Paraíba, Nordeste do Brasil (Fig. 1). A população estudada era constituída de ovinos
14 deslanados e caprinos adultos, de ambos os sexos, destinados ao abate. Para o cálculo do
15 número de animais a serem amostrados, foram considerados os seguintes parâmetros: (a)
16 prevalência esperada de 50% (utilizada para maximização da amostra); (b) erro absoluto de
17 5%; e (c) nível de confiança de 95%, conforme a fórmula para amostras aleatórias simples
18 (THRUSFIELD, 2007). De acordo com esses parâmetros o n amostral mínimo foi de 384
19 caprinos e 384 ovinos, no entanto foram utilizados 500 caprinos e 500 ovinos.

20

21 *Colheita de amostras:* O período de colheita das amostras foi de abril a dezembro de 2012.
22 Na linha de abate foram colhidas 1000 amostras de sangue, sendo 500 de cada espécie animal.
23 As amostras de sangue foram colhidas pouco antes da sangria dos animais, utilizando-se tubos
24 a vácuo estéreis de 8 mL devidamente identificados. Em seguida estes foram conduzidos ao
25 laboratório, onde foram centrifugados e as amostras de soro armazenadas a -20 °C até a
26 realização da prova sorológica.

27

28 *Teste sorológico:* A presença de anticorpos anti-*Leptospira* spp. foi determinada pela técnica
29 de soroaglutinação microscópica (SAM) (OIE, 2012), utilizando como antígenos uma coleção
30 de cepas de *Leptospira biflexa* sorovares Andamana e Patoc, *Leptospira interrogans*:
31 Australis, Copenhageni, Bataviae, Bratislava, Canicola, Grippotyphosa, Hardjoprajitno,
32 Pomona, Pyrogenes, Icterohaemorrhagiae, Hebdomadis, Wolffi, Butembo; *Leptospira*
33 *borgpetersenii*: Autumnalis, Castellonis, Hardjobovis, Javanica, Tarassovi, *Leptospira*
34 *santarosai*: Guaricura, Shermani; *Leptospira kirschneri*: Cynopteri, e *Leptospira noguchii*:

1 Panama cedidas pelo Laboratório de Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal
2 Fluminense (UFF) e oriundas do Instituto Pasteur, França. Todas as amostras com atividade
3 aglutinante na diluição de 1:100 foram consideradas positivas. As amostras positivas foram
4 tituladas de forma seriada na razão de dois. O ponto de corte era o tubo de maior diluição que
5 apresentasse 50% de aglutinações quando comparado com o controle. O maior título
6 alcançado foi usado para identificar o sorovar infectante.

7
8 *Análise estatística:* Para a verificação de associação entre soropositividade e o município de
9 origem dos animais foi utilizado o teste de qui-quadrado ou teste G, com nível de
10 significância de 5% (ZAR, 1999), utilizando-se o programa BioEstat 5.03.

11

12 **Resultados**

13

14 Dos 1000 animais analisados 82 (8,2% IC95%=7,0-10,5%) foram soropositivos, sendo
15 que a soroprevalência foi de 5,2% (26/500; IC95%=3,5-7,5%) nos caprinos e 11,2% (56/500;
16 IC95%=8,7-14,2%) nos ovinos (Tab. 1). Os sorovares mais frequentes nas espécies estudadas
17 foram Hardjobovis (14,6%) e Autumnalis (13,4%). Nos caprinos os sorovares mais frequentes
18 foram Hardjobovis (19,2%), Autumnalis e Patoc (15,4%), Bratislava, Castelonis, Pomona e
19 Icterohaemorrhagiae (11,6%), e Canicola (3,8%) (Tab. 2). Já nos ovinos foram Ballum
20 (17,9%), Autumnalis e Hardjobovis (12,5%), Castelonis (10,7%), Patoc e Pomona (8,9%),
21 Icterohaemorrhagiae e Javanica (7,1%), Bratislava e Shermani (5,4%) e Canicola (3,6%)
22 (Tab. 3). Houve diferença significativa na frequência de positivos entre os matadouros, tanto
23 para caprinos ($p = 0,035$) quanto para ovinos ($p = 0,004$), com o município de Alhandra
24 apresentando a maior frequência de soropositivos para ambas as espécies.

25

26 **Discussão**

27

28 A frequência de soropositivos identificada em ovinos nesse estudo foi inferior quando
29 comparada à maioria dos trabalhos conduzidos nessa espécie em outras regiões do Brasil:
30 34,3% no Rio Grande do Sul (HERRMANN et al., 2004); 33,3% em Rondônia (AGUIAR et
31 al., 2010); 22% em Minas Gerais (SALABERRY et al., 2011); 47,4% no Estado do Rio de
32 Janeiro (MARTINS et al., 2012); 22,8% em São Paulo (RIZZO et al., 2014). Contudo, os
33 resultados foram superiores às frequências encontradas em inquéritos realizados na região
34 Nordeste, que variaram de 3,5% encontrados por Azevedo et al. (2004) no Rio Grande do

1 Norte a 7,5% na Paraíba (HIGINO et al., 2010). Em caprinos os resultados foram inferiores a
2 alguns trabalhos realizados: 11,1% no Rio de Janeiro (LILENBAUM et al., 2007); 31,3% em
3 Minas Gerais (SANTOS et al., 2012); 25,9% no Rio de Janeiro (MARTINS et al., 2012);
4 14,5% no Rio Grande do Norte (ARAÚJO NETO et al., 2010). Resultado semelhante (8,7%)
5 foi encontrado na Paraíba (HIGINO et al., 2012).

6 A baixa reatividade encontrada no presente estudo, em comparação a trabalhos em
7 outras regiões do Brasil, pode estar associada a uma possível diferença de susceptibilidade
8 entre raças nas espécies estudadas. Alguns trabalhos evidenciaram a raça como fator de risco
9 para leptospirose em pequenos ruminantes, em que foi observada maior susceptibilidade à
10 infecção entre animais de raça pura do que em animais mestiços (SILVA et al., 2012;
11 SANTOS et al., 2012). No semiárido do Nordeste do Brasil, mais de 90% do plantel
12 corresponde a ovinos de raças mestiças (CEZAR et al., 2004), e o rebanho caprino é
13 composto basicamente por animais do tipo nativo e Sem Raça Definida (SRD), de notável
14 rusticidade (SILVA; ARAÚJO, 2000). Assim sendo, é possível sugerir a hipótese de que,
15 além das condições ambientais, a rusticidade dessas espécies estudadas colabora para a baixa
16 sororreatividade verificada no presente estudo. Cabe destacar que apesar de bem estabelecida
17 a relação entre a pluviosidade e frequência de animais sororreativos (ALVES et al., 1996;
18 VANASCO et al., 2008), o mesmo fenômeno não foi observado em bovinos da mesma
19 região, com 61,1% de sororreatividade (PIMENTA et al., 2014).

20 Os sorovares Hardjobovis e Autumnalis foram os mais frequentes em caprinos e
21 ovinos no presente estudo, o que corrobora com os achados de inquéritos sorológicos recentes
22 realizados no Brasil que também citaram esses como os mais frequentes em pequenos
23 ruminantes (HERRMANN et al., 2004; LILENBAUM et al., 2007; ; ARAÚJO NETO et al.,
24 2010; HIGINO et al., 2010; SALABERRY et al., 2011; CARVALHO et al., 2011; SANTOS
25 et al., 2012; MARTINS et al., 2012; MORAES et al., 2012; ALVES et al., 2012; HIGINO et
26 al., 2012; RIZZO et al., 2014). Apesar de que a criação consorciada com bovinos e a presença
27 de roedores tem sua importância na disseminação dos sorovares Harjdjobovis e Autumnalis,
28 respectivamente (FAINE et al., 1999; SALABERRY et al., 2011; SEIXAS et al., 2011),
29 durante muito tempo se acreditou que esses animais adquiriam leptospirose apenas por
30 contato prévio com outras espécies (LEON-VIZCAINO et al., 1987). Contudo, relatos de
31 leptospirúria pelo sorovar Hardjo em caprinos e ovinos, sem contato com bovinos (COUSINS
32 et al., 1989; GERRISTSEN et al., 1994; DORJEE et al., 2008), assim como inúmeros relatos
33 do sorovar Autumnalis como o mais frequente em pequenos ruminantes, levantam a hipótese
34 de que esses podem ser possíveis hospedeiros de manutenção desses sorovares, já que nem

1 mesmo o elevado acumulado de chuvas em algumas regiões foi suficiente para aumentar a
2 resposta imunológica humoral dos animais, predominando títulos de anticorpos de 1:100
3 (62,2%) nas espécies analisadas nesse estudo, o que pode indicar adaptabilidade dessas
4 espécies e possíveis portadores crônicos da doença.

5 São inúmeros os riscos atribuídos à presença desses sorovares, uma vez que o sorovar
6 Hardjo tem sido considerado o mais frequente causador de problemas reprodutivos
7 (abortamentos), infecções subclínicas e morte de animais jovens em pequenos ruminantes
8 (FAINE et al., 1999; HERRMANN et al., 2004; LILENBAUM et al., 2009). O Autumnalis,
9 apesar de já ter sido isolado em ovinos (SILVA et al., 2007), até o momento as vacinas
10 veterinárias comerciais não possuem esse sorovar em sua composição e sua virulência nas
11 espécies ainda não foi bem estabelecida, tornando assim os ovinos, ou no contexto geral os
12 pequenos ruminantes, importantes fontes de infecção desse sorovar para outras espécies e
13 seres humanos (ALVES et al., 2012), colocando em risco ocupacional os profissionais do
14 matadouro. Na Nova Zelândia, trabalhadores de matadouros constituem cerca de 50% de
15 todos os casos de leptospirose humana, maior que a taxa de trabalhadores rurais infectados
16 (DORJEE et al., 2011). Dorjee et al. (2008) relataram que o matadouro apresenta potencial
17 risco de transmissão da leptospirose devido a exposição dos trabalhadores. Silva et al. (2012),
18 descreveram que ovinos podem desempenhar o papel de reservatórios de *Leptospira* spp. para
19 os seres humanos e outros animais domésticos e transmitir a doença para os funcionários dos
20 matadouros, que manuseiam sangue e tecidos viscerais sem equipamentos de proteção
21 individual.

22 O sorovar Ballum, embora pouco comum nos trabalhos de prevalência realizados no
23 Brasil, foi o mais frequente na espécie ovina nesse estudo. Sorovares pouco tradicionais vem
24 se destacando nos inquéritos sorológicos, Silva et al. (2010) relataram que o destaque de
25 novos sorovares e a supressão dos tipos comuns, pode estar atrelado ao fato da maioria
26 das vacinas não incluir aqueles na sua composição. Na medida em que os animais não estão
27 imunizados, estes ficam expostos à doença por esses sorovares e atuam como fonte de
28 infecção para outros animais e seres humanos. O Ballum vem ganhando destaque no número
29 de casos humanos de leptospirose, uma vez que se tornou o segundo mais frequente na Nova
30 Zelândia (THORNLEY et al., 2002). Em Cuba, foi recentemente relatado como a principal
31 causa de leptospirose humana (SILVA et al., 2010). Na natureza, atuam como principais
32 reservatórios desse sorovar os pequenos camundongos ou ratos domésticos (BHARTI et al.,
33 2003). Normalmente esses reservatórios não apresentam doença clínica e podem eliminar
34 intermitentemente leptospiras através da urina por longos períodos no ambiente (SILVA et al.,

1 2010). Na região Sul do Brasil, chegou-se ao isolamento do serogrupo Ballum em quatro
2 camundongos capturados em residências, estes pertenciam à espécie *Mus musculus* e suas
3 estirpes possuíam vários graus de virulência (SILVA et al., 2010). É possível que devido ao
4 período de baixa precipitação pluviométrica que se encontrava o Estado da Paraíba no
5 momento das coletas, por conseguinte a falta de alimentos, reservatórios desse sorovar podem
6 ter tido acesso aos ovinos quando procuravam abrigos e alimentos próximos a currais e
7 depósitos de ração, sobrevivendo assim o contato direto ou indireto com a urina contaminada.

8 O serogrupo Ballum engloba o sorovar Castellonis, também reagente nesse estudo.
9 Esse tem como mais frequente reservatório os animais silvestres (ALVES et al., 1996), cuja
10 presença já foi apontada como fator de risco para leptospirose bovina na região (PIMENTA et
11 al., 2014). Na Paraíba, um dos mais comuns roedores silvestres é o preá (*Cavia aperea*)
12 (ALVES et al., 1996), que também é um importante reservatório da sorovariedade
13 *Icterohaemorrhagiae* (CUBAS et al., 2007). Santos et al. (2000) isolaram leptospirosas
14 patogênicas a partir de rins de preás (*Cavia aperea*) na Paraíba, demonstrando a importância
15 desse roedor como potencial reservatório de leptospirosas. No entanto, pouco pode ser feito
16 com relação a espécies silvestres, visto que muitas são protegidas por lei e esses obstáculos
17 legais impedem o acesso e captura para uma investigação mais criteriosa e detalhada,
18 favorecendo assim a participação desses na epidemiologia da doença e dificultando seu
19 controle.

20 O fato do matadouro de Alhandra, localizado na mesorregião da Mata Paraibana,
21 apresentar a maior frequência de soropositividade nas espécies estudadas, pode estar
22 relacionado ao elevado índice pluviométrico (1.511,1 mm) registrado no município em 2012,
23 acima do mínimo estabelecido (500 a 550 mm) para a sobrevivência ambiental de leptospirosas
24 na região, bem como para os mecanismos de disseminação da doença (ALVES et al., 1996).
25 Essa mesorregião ter se destacado mesmo com o Estado da Paraíba atravessando um
26 momento de chuvas abaixo do esperado (AESAS, 2014), pode estar relacionado ao fato desta
27 se localizar em uma região de clima tropical atlântico, diferentemente do restante do Estado
28 onde se predomina o semiárido (GIRARDI; ROSA, 2011). Em regiões tropicais e
29 subtropicais, com chuvas fortes, a ocorrência de leptospirose já é esperada nos rebanhos
30 (SALABERRY et al., 2011). Segundo Lilenbaum et al. (2007), o clima foi identificado como
31 fator de risco para sororreatividade a leptospirose, com animais de rebanhos de clima tropical
32 apresentando 2,63 mais chances de serem sororreagentes.

1 **Conclusão**

2

3 Conclui-se que ovinos e caprinos da região semiárida do Nordeste podem estar
4 adaptados aos sorovares Hardjobovis e Autumnalis, bem como roedores silvestres estarem
5 envolvidos na transmissão da doença. Possivelmente as condições climáticas influenciaram na
6 transmissibilidade da leptospirose, especialmente na mesorregião da Mata Paraibana,
7 entretanto não foi considerada suficiente para justificar a ocorrência de baixos títulos de
8 anticorpos verificada nos animais. Deste modo, é possível sugerir a hipótese de que a
9 rusticidade dos pequenos ruminantes na região estudada contribuiu para a baixa
10 sororreatividade verificada.

11

12 **Referências**

13

14 ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary*
15 *Microbiology*, Geneva, v. 140, p. 287–296, 2010.

16

17 AESA. Monitoramento Pluviométrico. Agência Executiva de Gestão das Águas do Estado da
18 Paraíba. 2014. Disponível em:
19 <<http://site2.aesa.pb.gov.br/aesa/monitoramentoPluviometria.do?metodo=listarAnosChuvasa>
20 [nuais](http://site2.aesa.pb.gov.br/aesa/monitoramentoPluviometria.do?metodo=listarAnosChuvasa)> Acesso em: 30 nov. 2014.

21

22 AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; VASCONCELLOS, S. A.; SOUZA, G. O.;
23 LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M. A.; GENNARI, S.M. Anticorpos anti-*Leptospira* spp.
24 em ovinos do Município de Monte Negro, Estado de Rondônia. *Arquivos do Instituto*
25 *Biológico*, São Paulo, SP, v. 77, n. 3, p. 529-532, 2010.

26

27 ALVES, C. J.; ALCINDO, J. F.; FARIAS, A. E. M.; HIGINO, S. S. S.; SANTOS, F. A.;
28 AZEVEDO, S. S.; COSTA, D. F.; SANTOS, C. S. A. B. Caracterização epidemiológica e
29 fatores de risco associados à leptospirose em ovinos deslanados do semiárido Brasileiro.
30 *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, RJ, v. 32, n. 6, p. 523-528, 2012.

31

32 ALVES, C. J.; VASCONCELLOS, S. A.; CAMARGO, C. R. A.; MORAIS, Z .M. Influência
33 dos fatores ambientais sobre a proporção de caprinos soro-reatores para a leptospirose em

- 1 cinco centros de criação do Estado da Paraíba, Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico*, São
2 Paulo, SP, v. 63, n. 2, p. 11-8, 1996.
- 3
- 4 ARAÚJO NETO, J. O.; ALVES, C. J.; AZEVEDO, S. S.; SILVA, M. L. C. R.; BATISTA, C.
5 S. A. Soroprevalência da leptospirose em caprinos da microrregião do Seridó Oriental, Estado
6 do Rio Grande do Norte, Brasil, e pesquisa de fatores de risco. *Veterinary
7 Research and Animal Science*, São Paulo, SP, v. 47, n. 2, p. 150-155, 2010.
- 8
- 9 AZEVEDO, S. S.; ALVES, C. J.; ANDRADE, J. S. L.; BATISTA, C. S. A.;
10 CLEMENTINO, I. J.; SANTOS, F. A. Ocorrência de aglutininas anti-*Leptospira* em ovinos
11 do estado do Rio Grande do Norte, Brasil. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, Niterói,
12 RJ, v. 11, n. 3, p. 167-170, 2004.
- 13
- 14 BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICALDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.;
15 LOVETT, M. A.; LEVETT, P. N.; GILMAN, R. H.; WILLIG, M. R.; GOTUZZO, E.;
16 VINETZ, J. M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet Infectious
17 Diseases*, Amsterdã, v. 3, p. 757 – 771, 2003.
- 18
- 19 BOURHY, P.; VRAY, M.; PICARDEAU, M. Evaluation of an in-house ELISA using the
20 intermediate species *Leptospira fainei* for diagnosis of leptospirosis. *Journal of Medical
21 Microbiology*, Edinburgh, v. 62, p. 822–827, 2013.
- 22
- 23 COUSINS, D. V.; ELLIS, T. M.; PARKINSON, J.; McGLASHAN, C. H. Evidence for sheep
24 as a maintenance host for *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*. *Veterinary Record*, v. 124,
25 p. 123-124, 1989.
- 26
- 27 CARVALHO, S. M.; GONÇALVES, L. M. F.; MACEDO, N. A.; GOTO, H. SILVA, S. M.
28 M. S.; MINEIRO, A. L. B. B.; KANASHIRO, E. H. Y.; COSTA, F. A. L. Infecção por
29 leptospirosas em ovinos e caracterização da resposta inflamatória renal. *Pesquisa Veterinária
30 Brasileira*, Rio de Janeiro, RJ, v. 31, n. 8, p. 637-642, 2011.
- 31
- 32 CEZAR, M. F.; SOUZA, B. B.; SOUZA, W. H.; PIMENTA FILHO, E. C.; TAVARES, G. P.;
33 MEDEIROS, G. X. Avaliação de parâmetros fisiológicos de ovinos Dorper, Santa Inês e seus

- 1 mestiços perante condições climáticas do trópico Semi-Árido nordestino. *Ciência e*
2 *Agrotecnologia*, Lavras, MG, v. 28, n. 3, p. 614-634, 2004.
- 3
- 4 CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. *Tratado de Animais Selvagens:*
5 *medicina veterinária*. São Paulo: Roca, 2007. 1376p.
- 6
- 7 DA HORA, P. C.; FREITAS, A. A. F.; PLUTARCO, F. F.; IPIRANGA, A. S. R. O efeito
8 potencial da transferência de conhecimento de processos biotecnológicos na cadeia produtiva
9 da caprinovinocultura. *Organizações Rurais & Agroindustriais*, Lavras, MG, v. 15, n. 1, p.
10 117-136, 2013.
- 11
- 12 DORJEE, S.; HEUER, C.; JACKSON, R.; WEST, D. M.; COLLINS-EMERSON, J. M.;
13 MIDWINTER, A. C.; RIDLER, A. L. Prevalence of pathogenic *Leptospira* spp. in sheep in a
14 sheep-only abattoir in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, Wellington, v. 56, n. 4,
15 p. 164-170, 2008.
- 16
- 17 DORJEE, S.; HEUER, C.; JACKSON, R.; WEST, D. M.; COLLINS-EMERSON, J. M.;
18 MIDWINTER, A. C.; RIDLER, A. L. Assessment of occupational exposure to leptospirosis
19 in a sheep-only abattoir. *Epidemiology & Infection*, Cambridge, v. 139, p. 797-806, 2011.
- 20
- 21 ELLIS, W. A. Animal Leptospirosis. *Current Topics in Microbiology Immunology*, Berlin, v.
22 387, p. 99-137, 2015.
- 23
- 24 ESCÓCIO, C. F. *Papel do ovino na cadeia epidemiológica da leptospirose pela Leptospira*
25 *spp. sorovar Hardjo: fatores de risco que envolvem a infecção e transmissão entre ovinos e*
26 *bovinos*. 2009. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal, Segurança Alimentar e o
27 Ambiente) - Instituto Biológico, São Paulo, SP.
- 28
- 29 FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. *Leptospira and leptospirosis*. 2. ed.
30 Melbourne: MediSci, 1999. 272p.
- 31
- 32 GERRITSEN, M. J.; KOOPMANS, M. J.; PETERSE, D.; Olyhoek, T. Sheep as maintenance
33 host for *Leptospira interrogans* sorovar Hardjo subtype Hardjobovis. *American Journal of*
34 *Veterinary Research*, Schaumburg, v. 55, p. 1232-1237, 1994.

- 1
2 GIANGASPERO, M., BONFINI, B., ORUSA, R., SAVINI, G., OSAWA, T.; HARASAWA,
3 R. Epidemiological survey for *Toxoplasma gondii*, *Chlamydia psittaci* var. *ovis*,
4 *Mycobacterium paratuberculosis*, *Coxiella burnetii*, *Brucella* spp., leptospirosis, and Orf Virus
5 among sheep from northern districts of Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science*,
6 Tokyo, v. 75, p. 679–684, 2013.
- 7
8 GIRARDI, G.; ROSA, J. V. *Atlas geográfico do estudante*. São Paulo: FDS S. A., 2011.
9 160p.
- 10
11 HERRMANN, G. P.; LAGE, A. P.; MOREIRA, E. C. Soroprevalência de aglutininas anti-
12 *Leptospira* spp. em ovinos nas Mesorregiões Sudeste e Sudoeste do Estado Rio Grande do
13 Sul, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, RS, v. 34, n. 2, p. 443-448, 2004.
- 14
15 HIGINO, S. S. S.; AZEVEDO, S. S.; ALVES, C. J.; FIGUEIREDO, S. M.; SILVA, M. L. C.
16 R.; BATISTA, C. S. A. Frequência de leptospirose em ovinos abatidos no Município de
17 Patos, Paraíba. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, SP, v. 77, n. 3, p. 525-527, 2010.
- 18
19 HIGINO, S. S. S.; ALVES, C. J.; SANTOS, C. S. A. B.; VASCONCELLOS, S. A.; SILVA,
20 M. L. C. R.; BRASIL, A. W. L.; PIMENTA, C. L. R. M.; AZEVEDO, S. S. Prevalência de
21 leptospirose em caprinos leiteiros do semiárido paraibano. *Pesquisa Veterinária Brasileira*,
22 Rio de Janeiro, RJ, v. 32, n. 3, p.: 199-203, 2012.
- 23
24 IBGE. Produção Pecuária Municipal. *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, BRASIL*.
25 2011. Disponível em:
26 <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2011/default_pdf.shtm> Acesso em:
27 14 dez. 2014.
- 28
29 LEON-VIZCAINO, L.; HERMOSO de MENDOZA, M.; GARRIDO, F. Incidence of
30 abortions caused by leptospirosis in sheep and goats in Spain. *Comparative Immunology*,
31 *Microbiology & Infectious Diseases*, Oxford, v. 10, p. 149-153, 1987.
- 32
33 LILENBAUM, W.; SOUZA, G. N.; RISTOW, P.; MOREIRA, M. C.; FRÁGUAS, S.;
34 CARDOSO, V. S.; OELEMANN, W. M. R. A serological study on *Brucella abortus*, caprine

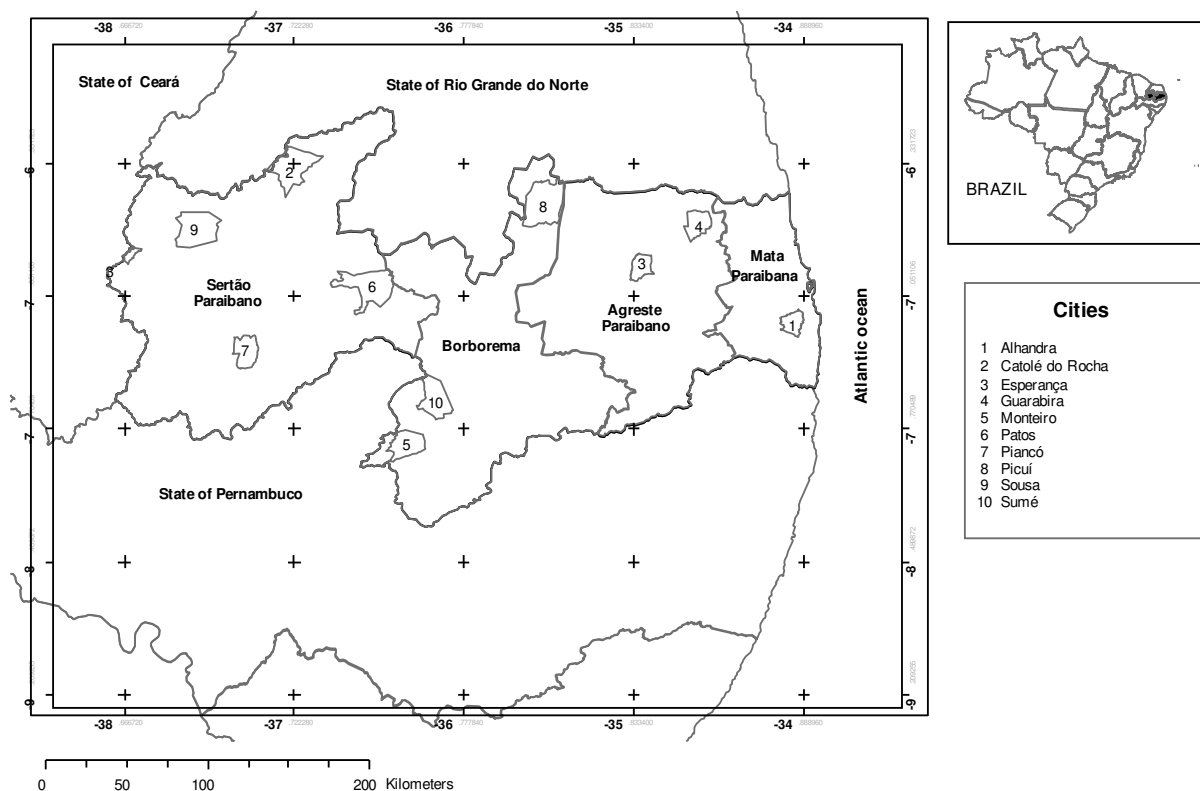
- 1 arthritis-encephalitis virus and *Leptospira* in dairy goats in Rio de Janeiro, Brazil. *The*
2 *Veterinary Journal*, Amsterdã, v. 173, p. 408–412, 2007.
- 3
- 4 LILENBAUM, W.; VARGES, R.; MEDEIROS, L. CORDEIRO, A. G.; CAVALCANTI, A.;
5 SOUZA, G. N.; RICHTZENHAIN, L.; VASCONCELLOS, S. A. Risk factors associated
6 with leptospirosis in dairy goats under tropical conditions in Brazil. *Research in Veterinary*
7 *Science*, London, v. 84, p. 14-21, 2008.
- 8
- 9 LILENBAUM, W.; VARGES, R.; RISTOW, P.; CORTEZ, A.; SOUZA, S.
10 O.; RICHTZENHAIN, L. J.; VASCONCELLOS, S. A. Identification of *Leptospira* spp.
11 carriers among seroreactive goats and sheep by polymerase chain reaction. *Research*
12 *in Veterinary Science*, London, v. 87, p. 16-19, 2009.
- 13
- 14 MARTINS, G.; PENNA, B.; HAMOND, C.; LEITE, R. C.; SILVA, A.; FERREIRA, A.;
15 BRANDÃO, F.; OLIVEIRA, F.; LILENBAUM, W. Leptospirosis as the most frequent
16 infectious disease impairing productivity in small ruminants in Rio de Janeiro, Brazil.
17 *Tropical Animal Health and Production*, Edinburgh, v. 44, n. 4, p.773-777, 2012.
- 18
- 19 MARTINS, G.; LILENBAUM, W. Leptospirosis in sheep and goats under tropical
20 conditions. *Tropical Animal Health and Production*, Edinburgh, v.46, p.11–17, 2014.
- 21
- 22 MORAES, C. C. G.; GUERREIRO, A. N.; KURODA, A. B. S.; SOUZA, V. A. F.;
23 MENESES, A. M. C.; VASCONCELLOS, S. A.. Inquérito sorológico para leptospirose em
24 rebanhos de ovinos no município de Igarapé-Açu, Estado do Pará. *Revista de Ciências*
25 *Agrarias*, Belém, PA, v. 55, n. 1, p. 58-60, 2012.
- 26
- 27 OIE. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 6. ed. Paris: World
28 Organisation for Animal Health, 2012. 1343p.
- 29
- 30 PIMENTA, C. L. R. M.; CASTRO, V.; CLEMENTINO, I. J.; ALVES, C. J.; FERNANDES,
31 L. G.; BRASIL, A. W. L.; SANTOS, C. S. A. B.; AZEVEDO, S. S. Leptospirose bovina no
32 Estado da Paraíba: prevalência e fatores de risco associados à ocorrência de propriedades
33 positivas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, RJ, v. 34, n. 4, p. 332-336, 2014.
- 34

- 1 RIZZO, H.; GREGORY, L.; BERARDI, F.; CASTRO, V.; DE MORAIS, Z. M.;
2 VASCONCELLOS, S. A. Soropositividade para leptospirose e desempenho reprodutivo de
3 ovinos de criatórios localizados no estado de São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de*
4 *Medicina Veterinária*, Rio de Janeiro, RJ, v. 36, n. 3, p. 244-250, 2014.
5
- 6 SALABERRY, R. S. S.; CASTRO, V.; NASSAR, A. F. C.; CASTRO, J. R.; GUIMARÃES,
7 E. C.; LIMA-RIBEIRO, A. M. C.. Seroprevalence and risk factors of antibodies against
8 leptospira spp. in ovinos from Uberlândia municipality, Minas Gerais state, Brazil. *Brazilian*
9 *Journal of Microbiology*, São Paulo, SP, v. 42, p. 1427-1433, 2011.
10
- 11 SANTOS, F. A.; ALVES, C. J.; AZEVEDO, S. S.; ANDRADE, J. S. L.; CLEMENTINO, I.
12 J.; FREITAS, T. D. Isolamento de leptospiros patogênicas a partir do tecido renal de roedor
13 silvestre (*Galea spixii spixii*). In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPB, 8.,
14 2000, João Pessoa, *Resumos...* João Pessoa: Editora universitária/UFPB, 2000. p. 135.
15
- 16 SANTOS, J. P.; LIMA-RIBEIRO, A.; OLIVEIRA, P.; SANTOS, M.; FERREIRA, A.;
17 MEDEIROS, A.; TAVARES, T. Seroprevalence and risk factors for Leptospirosis in goats in
18 Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. *Tropical Animal Health and Production*, Edinburgh, v. 44,
19 p. 101–106, 2012.
20
- 21 SEIXAS, L. S., MELO, C. B., LEITE, R. C., MOREIRA, E. C., MC MANUS, C. M.;
22 CASTRO, M. B. Anti-*Leptospira* sp. agglutinins in ewes in the Federal District, Brazil.
23 *Tropical Animal Health and Production*, Edinburgh, v. 43, p. 9-11, 2011.
24
- 25 SILVA, E. F.; BROD, C. S.; CERQUEIRA, G. M.; BOURSCHEIDT, D.; SEYFFERT, N.;
26 QUEIROZ, A.; SANTOS, C. S.; KO, A. I.; DELLAGOSTIN, O. A. Isolation of *Leptospira*
27 *noguchii* from sheep. *Veterinary Microbiology*, Amsterdã, v. 121, p. 144–153, 2007.
28
- 29 SILVA, E. F.; FÉLIX, S. R.; CERQUEIRA, G. M.; FAGUNDES, M. Q.; NETO, A. C. P. S.;
30 GRASSMANN, A. A.; AMARAL, M. G.; GALLINA, T.; DELLAGOSTIN, O. A. Short
31 Report: Preliminary Characterization of *Mus musculus* –Derived Pathogenic Strains of
32 *Leptospira borgpetersenii* Serogroup Ballum in a Hamster Model. *The American Journal of*
33 *Tropical Medicine and Hygiene*, Deerfield, v. 83, n. 2, p. 336–337, 2010.
34

- 1 SILVA, F. L. R.; ARAÚJO, A. M. Desempenho Produtivo em Caprinos Mestiços no Semi-
2 árido do Nordeste do Brasil. *Revista brasileira de zootecnia*, Brasília, DF, v. 29, n. 4, p. 1028-
3 1035, 2000.
- 4
- 5 SILVA, R. C.; COSTA, V. M.; SHIMABUKURO, F. H.; RICHINI-PEREIRA, V. B.;
6 MENOZZI, B. D.; LANGONI, H. Frequency of *Leptospira* spp. in sheep from Brazilian
7 slaughterhouses and its association with epidemiological variables. *Pesquisa Veterinária*
8 *Brasileira*, Rio de Janeiro, v.32, n.3, p.194-198, 2012.
- 9
- 10 THORNLEY, C. N.; BAKER, M. G.; WEINSTEIN, P.; MAAS, E. W. Changing
11 epidemiology of human leptospirosis in New Zealand. *Epidemiology & Infection*, Cambridge,
12 v. 128, p. 29–36, 2002.
- 13
- 14 THRUSFIELD, M. *Veterinary epidemiology*. 2. ed. Cambridge: Blackwell Science. 1995.
15 479p.
- 16
- 17 VANASCO, N. B.; SCHMELING, M. F.; LOTTESBERGER, J.; COSTA, F.; KO, A. I.
18 TARABLA H. D. Clinical characteristics and risk factors of human leptospirosis in Argentina
19 (1999-2005). *Acta Tropica*, Amsterdã, v. 107, p. 255-258, 2008.
- 20
- 21 ZAR, J. H. *Biostatistical Analysis*. 4. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1999. 663p.
- 22

23 **Lista de figuras**

24



1
2 **Figura 1.** Representação geográfica das cidades que tiveram matadouros amostrados no
3 Estado da Paraíba, semiárido do Nordeste brasileiro, no período de abril a dezembro de 2012.
4

5 Lista de tabelas

6
7 **Tabela 1.** Frequência de soropositivos para *Leptospira* spp., segundo município de origem e
8 índice pluviométrico anual em caprinos e ovinos submetidos ao abate no Estado da Paraíba,
9 Nordeste do Brasil, no período de abril a dezembro de 2012.

Município	Caprinos		Ovinos		Índice pluviométrico (mm)*
	Nº de animais	Nº de positivos (%)	Nº de animais	Nº de positivos (%)	
Alhandra	50	7 (14)	50	14 (28)	1.511,1
Catolé do Rocha	50	4 (8)	50	6 (12)	410,0
Esperança	50	3 (6)	50	4 (8)	518,7
Guarabira	50	3 (6)	50	8 (16)	828,4
Monteiro	50	2 (4)	50	3 (6)	194,1
Patos	50	1 (2)	50	3 (6)	199,1
Piancó	50	4 (8)	50	4 (8)	232,6
Picuí	50	-	50	1 (2)	45,7
Sousa	50	-	50	9 (18)	406,5
Sumé	50	2 (4)	50	4 (8)	27,0
Total (%)	500 (100)	26 (5,2)	500 (100)	56 (11,2)	-

10 * AESA- Agência Executiva de Gestão das Águas do Estado da Paraíba

1 **Tabela 2.** Sorovares de *Leptospira* spp. mais prevalentes em caprinos com respectivos títulos
 2 em matadouros do Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil, no período de abril a dezembro de
 3 2012.

Sorovares	Títulos				Total (%)
	100	200	400	800	
Hardjobovis	3	2	-	-	5 (19,2)
Autumnalis	2	2	-	-	4 (15,4)
Patoc	3	1	-	-	4(15,4)
Bratislava	2	1	-	-	3 (11,6)
Castelonis	3	-	-	-	3 (11,6)
Pomona	-	2	-	1	3 (11,6)
Icterohaemorrhagiae	2	1	-	-	3 (11,6)
Canicola	-	-	1	-	1 (3,6)
Total (%)	15 (57,7)	9 (34,7)	1 (3,8)	1 (3,8)	26 (100)

4

5

6 **Tabela 3.** Sorovares de *Leptospira* spp. mais prevalentes em ovinos com respectivos títulos
 7 em matadouros do Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil, no período de abril a dezembro de
 8 2012.

Sorovares	Títulos				Total (%)
	100	200	400	800	
Ballum	6	2	2	-	10 (17,9)
Autumnalis	4	3	-	-	7 (12,5)
Hardjobovis	6	1	-	-	7 (12,5)
Castelonis	5	1	-	-	6 (10,7)
Patoc	5	-	-	-	5 (8,9)
Pomona	1	2	-	2	5 (8,9)
Icterohaemorrhagiae	2	1	1	-	4 (7,1)
Javanica	1	2	-	1	4 (7,1)
Bratislava	2	1	-	-	3 (5,4)
Shermani	3	-	-	-	3 (5,4)
Canicola	1	-	1	-	2 (3,6)
Total (%)	36 (64,3)	13 (23,2)	4 (7,1)	3 (5,4)	56 (100)

9

1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

2

3 Este trabalho é o primeiro a detectar molecularmente *Leptospira* spp. em ovinos na
4 região semiárida do Nordeste brasileiro, bem como demonstrou a ocorrência de anticorpos
5 anti-*Leptospira* spp. dos principais sorovares presentes em pequenos ruminantes no Estado da
6 Paraíba, Nordeste do Brasil, ajudando assim na compreensão da epidemiologia da
7 leptospirose nessas espécies. Os resultados encontrados sugerem que ovinos e caprinos da
8 região semiárida do Nordeste podem estar adaptados aos sorovares Hardjobovis e
9 Autumnalis, bem como roedores silvestres estarem envolvidos na transmissão da doença.
10 Possivelmente as condições climáticas influenciaram na transmissibilidade da leptospirose,
11 entretanto não foi considerada suficiente para justificar a ocorrência de baixos títulos de
12 anticorpos verificada nos animais. Deste modo, é possível sugerir a hipótese de que a
13 rusticidade dos pequenos ruminantes na região estudada contribuiu para a baixa
14 sororreatividade verificada.

15 Uma vez que a leptospirose é uma importante zoonose, além de ser causa de
16 problemas reprodutivos e perdas econômicas nos rebanhos, sugere-se maior controle nos
17 mecanismos de transmissão já conhecidos, assim como um estudo de infecção experimental
18 para analisar a interação hospedeiro-parasita e o papel portador dos pequenos ruminantes em
19 relação aos possíveis sorovares adaptados e não adaptados nessas espécies.

ANEXO I

Artigo Submetido à revista Pesquisa Veterinária Brasileira- Versão Inglês

Serological and molecular survey of *Leptospira* spp. infection in sheep slaughtered in the semiarid region of Northeastern Brazil¹

Diego F. Costa², Aline F. Silva², Arthur W. L. Brasil², Ana P. P. Loureiro³, Fabrine A. Santos², Sergio S. Azevedo², Walter Lilenbaum³, Clebert J. Alves^{2*}

ABSTRACT.- Costa D. F., Silva A. F., Loureiro A. P. P., Santos F. A., Azevedo S. S., Lilenbaum W. & Alves C. J. 2015. [Serological and molecular survey of *Leptospira* spp. infection in sheep slaughtered in the semiarid region of Northeastern Brazil]. Estudo sorológico e molecular da infecção por *Leptospira* spp. em ovinos abatidos no semiárido do Nordeste do Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, Av. Universitária s/n, Patos, PB 58700-970, Brazil. E-mail: clebertja@uol.com.br.

The diagnosis of leptospirosis in sheep herds still constitutes a challenge, as in production animals the infection is predominantly subclinical with unspecific symptoms. The aim of the present survey was to detect *Leptospira* spp. DNA, to determine the frequency of specific antibodies and proceed the isolation of the agent in sheep slaughtered in the county of Patos, semiarid region of the State of Paraíba, Northeastern Brazil. Forty-nine samples of blood and renal tissue as well as 25 urine samples from a total of 49 sheep were collected in the slaughter line. To verify the presence of anti-*Leptospira* spp. antibodies the microscopic agglutination test (MAT) was used. Samples of kidneys and urine were used for the molecular detection and bacteriological cultivation of leptospires. By MAT there was 8.16% (4/49) of seropositivity. In the PCR of renal tissue three samples were positive, however, all urine samples were negative, as well as all samples were negative at bacteriological cultivation. As

¹Received
Accepted for publication

²Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária (UAMV), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Av. Universitária s/n, Caixa Postal 61, Santa Cecília, Patos, PB 58700-970, Brasil.*Corresponding author: clebertja@uol.com.br

³Universidade Federal Fluminense (UFF), Instituto Biomédico, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Rua Professor Hernani Melo 101, Niterói, RJ 24210-130, Brasil.

1 the climate conditions of the study period allowed the transmissibility of the leptospirosis, it is
2 suggested that the drought cannot be considered as the only factor responsible for the verified
3 low seroreactivity. Thus, it is possible to suggest the hypothesis that, in addition to the
4 environmental conditions, the rusticity of the mixed-bred sheep collaborated to the low
5 seroreactivity. The PCR revealed to be an important tool in the detection of animals carriers
6 of leptospires, demonstrating to be a sensitive technique even in negative animals.

7
8 INDEX TERMS: Leptospirosis, small ruminants, PCR, serology, isolation, slaughterhouse.

9
10 **RESUMO.-** O diagnóstico da leptospirose em rebanhos de ovelhas ainda constitui um
11 desafio, como em animais de produção a infecção é predominantemente subclínica com
12 sintomas inespecíficos. O objetivo do presente trabalho foi detectar DNA de *Leptospira* spp.,
13 determinar a frequência de anticorpos específicos e proceder ao isolamento do agente em
14 ovelhas deslanadas abatidas no semiárido do Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil. Quarenta
15 e nove amostras de sangue e tecido renal, bem como 25 amostras de urina de um total de 49
16 ovelhas foram coletados na linha de abate. Para verificar a presença de anticorpos anti-
17 *Leptospira* spp. o teste de aglutinação microscópica (SAM) foi utilizado. Amostras de rins e
18 urina foram utilizadas para detecção molecular e cultivo bacteriológico de leptospiros. Pela
19 SAM houve 8,2% (4/49) de soropositividade. Na PCR de tecido renal três amostras foram
20 positivas, no entanto, todas as amostras de urina foram negativas, assim como todas as
21 amostras foram negativas na cultura bacteriológica. Como as condições climáticas do período
22 de estudo permitiram a transmissibilidade da leptospirose, sugere-se que a seca não pode ser
23 considerada como o único fator responsável pela baixa sororreatividade verificada. Assim, é
24 possível sugerir a hipótese de que, além das condições ambientais, a rusticidade das ovelhas
25 de raças mestiças colaborou para baixa sororreatividade. A PCR revelou ser uma ferramenta
26 importante na detecção de animais portadores de leptospiros, demonstrando ser uma técnica
27 sensível mesmo em animais negativos.

28
29 TERMOS DE INDEXACAO: Leptospirose, pequenos ruminantes, PCR, sorologia,
30 matadouro.

31 32 INTRODUCTION 33

1 Sheep raising is an economic activity of great value for the Brazilian livestock industry and
2 mainly for the Northeast region, situated in an area covered by more than 30% of semiarid
3 region (Girardi & Rosa 2011). As in other developing countries, sheep raising in Brazil is
4 important in the income generation and subsistence of families (Pugh & Baird 2012). Due to
5 the low technification of the production, the infectious diseases gain prominence regarding
6 the decrease in productivity (Martins et al. 2012). Among these, leptospirosis is relevant, seen
7 as it is widely disseminated and determines abortions, birth of weak and premature lambs as
8 well as decrease in the milk production (Ellis 2015). The occurrence and amplitude of
9 leptospirosis in the herds is closely linked to environmental factors such as rainfall index,
10 humidity, topography, presence of rodents, wild animals and consociated animal rearing
11 (Alves et al. 1996, Lilenbaum et al. 2008)

12 The diagnosis of leptospirosis in sheep herds still constitutes a challenge, as in
13 production animals the infection is predominantly subclinical with unspecific symptoms
14 (Faine et al. 1999, Martins & Lilenbaum 2014). The microscopic agglutination test (MAT) is
15 the serological test recommended by the World Organization for Animal Health (OIE 2012).
16 For the identification of infected herds the use of MAT as a screening test associated
17 with polymerase chain reaction (PCR) for the detection of carrier animals are recommended
18 (Martins & Lilenbaum 2014).

19 The detection of *Leptospira* spp. DNA by PCR has been of great utility and is more
20 establishing itself in the laboratorial routine for the diagnosis of leptospirosis (Higino &
21 Azevedo 2014). Its main advantage is the high specificity, however it demands specific
22 materials, highly trained laboratorial and personnel, and it is restricted only to a few reference
23 laboratories (Bourhy et al. 2013).

24 The slaughterhouse is considered to be an excellent environment for the surveillance
25 of several infectious and contagious diseases, being it the place where the greatest
26 recuperation of viable leptospores can be obtained. However, the aim of the present work was
27 to identify leptospiral DNA, to determine the frequency of anti-*Leptospira* spp. agglutinins
28 and to proceed the isolation of the agent in sheep slaughtered in the semiarid region of the
29 State of Paraíba, Northeastern Brazil.

30

31

MATERIAL AND METHODS

32

33 **Study area:** The study was carried out in a slaughterhouse situated in the county of Patos
34 (07°01'28" S; 37°16'48"W) in the Sertão mesoregion of the State of Paraíba, semiarid region

1 of Northeastern Brazil. The studied population was constituted of adult female sheep,
2 intended for slaughter and originated from the county of Patos and surrounding areas (Fig.1).

3
4 **Sample collection:** With the intent of including both rainy and dry season, collections were
5 carried out from October 2013 to August 2014. Forty-nine samples of blood and renal tissue
6 as well as 25 urine samples from a total of 49 sheep were collected in the slaughter line.
7 Blood samples were collected before bleeding of the animals, using sterile 8 mL vacuum
8 tubes. Subsequently these samples were taken to the laboratory, where they were centrifuged
9 and serum samples were stored at -20°C until serological analyses. A kidney from each
10 animal was harvested and, in the laboratory, a portion of approximately 5g was aseptically
11 frozen at -20°C for the genomic DNA extraction. Another portion of approximately 1g was
12 sent to bacteriological isolation. Regarding the urine, it was collected by cystocentesis during
13 the evisceration with sterile syringes. Immediately after collection, 1 mL was destined to the
14 bacteriological processing and aliquots of 5mL were stored at -20°C for the extraction of
15 genomic DNA.

16
17 **Bacterial cultivation:** The samples of urine were cultivated immediately after the collection,
18 while kidney samples were firstly macerated with the use of sterile syringes and then were
19 inoculated in appropriate culture media. For the attempt of isolation, firstly the samples were
20 cultivated in semisolid EMJH medium (Difco, BD Franklin Lakes, NJ, USA), enriched with
21 Amphotericin B (0,05mg/mL), 5-fluorouracil (1mg/mL), fosfomicin (4mg/mL), trimethoprim
22 (0,2mg/mL), sulfamethoxazole (0,4mg/mL), so that they provided a concentration of 10%
23 (Chakraborty et al. 2010). After inoculation the tubes were transported to the laboratory at
24 room temperature. On the same day, the cultivated medias were submitted to serial dilution
25 (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) in Fletcher semisolid media (Difco, BD, Franklin Lakes, NJ, USA) with the
26 addition of 5-Fluorouracil (1mg/mL). After dilution, the tubes were incubated at 28°C to
27 30°C, and examined weekly in dark field microscopy during six weeks (Faine et al. 1999)

28
29 **Polymerase Chain Reaction (PCR):** The procedure for the extraction of *Leptospira* spp.
30 DNA was carried out with the Wizard® Genomic SV DNA Purification System kit
31 (Promega®, Madison, EUA). It were used *primers* *LipL32-45F* (5'-AAG CAT TAC TTG
32 CGC TGG TG-3') and *LipL32-286R* (5'-TTT CAG CCA GAA CTC CGA TT-3') (Stoddard et
33 al. 2009), which target the *LipL32* gene, specific for pathogenic leptospires. The methodology
34 previously described by Hamond et al. (2014) was used. DNA extracted from *Leptospira*

1 *interrogans* serovar Copenhageni Fiocruz L1130 strain was used as positive control and
2 ultrapure water as negative control.

3
4 **Serological test:** The presence of anti-*Leptospira* spp. Antibodies was determined by MAT
5 (OIE 2012), which included a collection of strains of *Leptospira biflexa* serovars Andamana
6 and Patoc; *Leptospira interrogans* serovars Australis, Copenhageni, Bataviae, Bratislava,
7 Canicola, Grippotyphosa, Hardjoprajitno, Pomona, Pyrogenes, Icterohaemorrhagiae,
8 Hebdomadis, Wolffii and Butembo; *Leptospira borgpeterseni* serovars Autumnalis,
9 Castellonis, Hardjobovis, Javanica and Tarassovi; *Leptospira santarosai* serovars Guaricura
10 and Shermani; *Leptospira kirschneri* serovar Cynopteri; and *Leptospira noguchii* serovar
11 Panama. These antigens were provided by the Veterinary Bacteriology Laboratory of the
12 Fluminense Federal University (UFF) and originated from the Pasteur Institute, France. All
13 samples with agglutinant activity in the dilution of 1:100 were considered positive, and the
14 titrated in 2-fold serial dilutions. The higher titer reached was used to identify the infecting
15 serogroup.

16 17 **RESULTS**

18
19 Four animals (8,2%) tested positive at MAT. The most frequent serovar was Javanica
20 (75%) followed by Autumnalis (25%), with titers from 100 to 800 (Table 1). Pure cultures of
21 *Leptospira* spp. were not obtained for any culture. Regarding the detection of leptospiral
22 DNA, in three samples (6.1%) the *LipL32* gene was amplified, however, all urine samples
23 were negative (Fig. 2). Among the three sheep positive at PCR in renal tissue, two were
24 seroreactive at MAT, both for serovar Javanica, with titers 200 and 800. The three animals
25 positive at PCR belonged to the same herd.

26 27 **DISCUSSION**

28
29 The frequency of seroreactive animals identified in the present study was significantly
30 lower than ones verified in surveys conducted in sheep in other Brazilian regions: 34.3% in
31 Rio Grande do Sul (Herrmann et al. 2004); 47.4% in Rio de Janeiro (Martins et al. 2012);
32 33.3% in Rondônia (Aguilar et al. 2010). However, that frequency was quite similar to those
33 found in surveys conducted in the semiarid region of Northeastern Brazil, which varied from
34 3.5% in Rio Grande do Norte (Azevedo et al. 2004) to 5.4% and 7.5% in Paraíba (Higino et

1 al. 2010). This extreme difference found among frequencies of seroreactive sheep in
2 Northeastern Brazil and when compared to other regions may be due to the lower rainfall
3 index in the Northeast region, in particular in the studied region, which presents semiarid
4 climate conditions.

5 The importance of the hydric transmission of leptospirosis is well established,
6 especially in tropical regions (Martins et al. 2010). The Northeast region has been suffering
7 from rainfall below the expected during the last three years, however it was verified that in
8 2014 the rainfall indexes reached about 800 mm in the county of Patos (Aesa 2014, Ipa 2014),
9 above the minimum established (500 to 550 mm) for the environmental survival of the
10 leptospire in the semiarid region, as well as for the dissemination mechanisms of the disease
11 (Alves et al. 1996). In this way, even though it plays an impact on the epidemiology of the
12 infection, the drought cannot be considered as the only factor responsible for the low
13 seroreactivity which was verified in sheep in the present study.

14 It is worth highlighting that even though the relation between the rainfall and the
15 frequency of seroreactive animals is well established (Alves et al. 1996, Vanasco et al. 2008),
16 the same phenomenon was not observed in bovines from the State of Paraíba, as a recent
17 study performed with bovines from this region reported that 61.1% of the animals were
18 reactive (Pimenta et al. 2014).

19 The low reactivity found in the present study may be associated with a possible
20 difference of susceptibility among sheep breeds. Some studies demonstrated the breed as a
21 risk factor for leptospirosis in small ruminants, in which a higher susceptibility to the
22 infection was found in pure bred animals compared with mixed-bred ones (Silva et al. 2012,
23 Santos et al. 2012). In the semiarid region of Northeastern Brazil, more than 90% of the herds
24 correspond to mixed-bred sheep (Cezar et al. 2004). That said, it is possible to suggest the
25 hypothesis that, in addition to the environmental conditions, the rusticity of the mixed-bred
26 sheep studied collaborates for the low seroreactivity verified in the present study.

27 Considering the difficulty of the isolation, its biological risk and the long period
28 necessary to perform it, the PCR reveals itself as an important tool in the identification of
29 leptospire carriers (Director et al. 2014). In the present study, the PCR demonstrated to be
30 more effective in the detection of the agent than the bacterial cultivation. Therefore, this
31 technique more and more firms itself in the diagnosis of animal leptospirosis.

32

33

CONCLUSION

34

1 Based on the results of the present study, it is possible to conclude that the leptospirosis was
2 not frequent among sheep in the semiarid region of the State of Paraíba in the studied period.
3 As the climate conditions of the study period allowed the transmissibility of the leptospirosis,
4 it is suggested that the drought cannot be considered as the only factor responsible for the
5 verified low seroreactivity. Thus, it is possible to suggest the hypothesis that, in addition to
6 the environmental conditions, the rusticity of the mixed-bred sheep collaborated to the low
7 seroreactivity. The PCR revealed to be an important tool in the detection of animals carriers
8 of leptospire, demonstrating to be a sensitive technique even in negative animals.

10 REFERENCES

- 12 Aesa. 2014. Monitoramento Pluviométrico. Agência Executiva de Gestão das Águas do
13 Estado da Paraíba (AESA). Disponível em
14 <<http://site2.aesa.pb.gov.br/aesa/monitoramentoPluviometria.do?metodo=listarAnosChuvasAnuais>> Acesso 30 nov. 2014.
15
- 16
- 17 Aguiar D.M., Cavalcante G.T., Vasconcellos S.A., Souza G.O., Labruna M.B., Camargo
18 L.M.A. & Gennari S.M. 2010. Anticorpos anti-*Leptospira* spp. em ovinos do Município de
19 Monte Negro, Estado de Rondônia. Arq. Inst. Biol. 77(3):529-532.
20
- 21 Alves C.J., Vasconcellos S.A., Camargo C.R.A. & Morais Z.M. 1996. Influência dos fatores
22 ambientais sobre a proporção de caprinos soro-reatores para a leptospirose em cinco
23 centros de criação do Estado da Paraíba, Brasil. Arq. Inst. Biol. 63(2):11-19.
24
- 25 Alves C.J., Alcindo J.F., Farias A.E.M., Higino S.S.S., Santos F.A., Azevedo S.S., Costa D.F.
26 & Santos C.S.A.B. 2012. Caracterização epidemiológica e fatores de risco associados à
27 leptospirose em ovinos deslanados do semiárido Brasileiro. Pesq. Vet. Bras. 32(6):523-
28 528.
29
- 30 Azevedo S.S., Alves C.J., Andrade J.S.L., Batista C.S.A., Clementino I.J. & Santos F.A.
31 2004. Ocorrência de aglutininas anti-*Leptospira* em ovinos do Estado do Rio Grande do
32 Norte, Brasil. Rev. Bras. Ciênc. Vet. 11(3):167-170.
33

- 1 Bourhy P., Vray M. & Picardeau M. 2013. Evaluation of an in-house ELISA using the
2 intermediate species *Leptospira fainei* for diagnosis of leptospirosis. J. Med. Microbiol.
3 62:822–827.
4
- 5 Cezar M.F., Souza B.B., Souza W.H., Pimenta-Filho E.C., Tavares G.P. & Medeiros G.X.
6 2004. Avaliação de parâmetros fisiológicos de ovinos Dorper, Santa Inês e seus mestiços
7 perante condições climáticas do trópico Semi-Árido nordestino. Ciênc. Agrotec. 28(3):614-
8 634.
9
- 10 Chakraborty A., Miyahara S., Villanueva S.Y.A.M., Gloriani N.G. & Yoshida S. 2010. *In*
11 *Vitro* Sensitivity and Resistance of 46 *Leptospira* Strains Isolated from Rats in the
12 Philippines to 14 Antimicrobial Agents. Antimicrob. Agents Chemother. 54(12):5403–
13 5405.
- 14 Director A., Martins G.M.S., Loureiro A.P.P., Hamond C.R.M.R., Medeiros M.A. &
15 Lilenbaum W. 2014. Molecular detection of leptospiral carriers in sheep under tropical
16 field conditions. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 51(3):220-223.
17
- 18 Ellis W. A. 2015. Animal Leptospirosis. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 387:99-137.
19
- 20 Faine S., Adler B., Bolin C. & Perolat P. 1999. *Leptospira and leptospirosis*. 2nd ed. MediSci,
21 Melbourne. 272p.
22
- 23 Girardi G. & Rosa J.V. 2011. *Atlas geográfico do estudante*. Editora FDT S. A., São Paulo.
24 160p.
25
- 26 Hamond C., Martins G., Loureiro A.P., Pestana C., Lawson-Ferreira R., Medeiros M.A. &
27 Lilenbaum W. 2014. Urinary PCR as an increasingly useful tool for an accurate diagnosis
28 of leptospirosis in livestock. Vet. Res. Commun. 38:81–85.
29
- 30 Herrmann G.P., Lage A.P. & Moreira E.C. 2004. Soroprevalência de aglutininas anti-
31 *Leptospiraspp.* em ovinos nas Mesorregiões Sudeste e Sudoeste do Estado Rio Grande do
32 Sul, Brasil. Cienc. Rural. 34(2):443-448.
33

- 1 Higino S.S.S., Azevedo S.S., Alves C.J., Figueiredo S.M., Silva M.L. C.R. & Batista C.S.A.
2 2010. Frequência de leptospirose em ovinos abatidos no Município de Patos, Paraíba. Arq.
3 Inst. Biol. 77(3):525-527.
4
- 5 Higino S.S.S. & Azevedo S.S. 2014. Leptospirose em pequenos ruminantes: situação
6 epidemiológica atual no Brasil. Arq. Inst. Biol. 81(1):86-94.
7
- 8 Ipa. 2014. Sessão de Índices Pluviométricos. Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA).
9 Disponível em<http://www.ipa.br/indice_pluv.php> Acesso 02 dez. 2014.
10
- 11 Lilenbaum W., Vargas R., Medeiros L., Cordeiro A.G., Cavalcanti A., Souza G.N.,
12 Richtzenhain L. & Vasconcellos S.A. 2008. Risk factors associated with leptospirosis in
13 dairy goats under tropical conditions in Brazil. Res. Vet. Sci. 84:14–21.
14
- 15 Martins G., Penna B. & Lilenbaum W. 2010. Maintenance of *Leptospira* infection in cattle
16 under tropical conditions. Vet. Rec. 167:629–630.
17
- 18 Martins G., Penna B., Hamond C., Leite R.C., Silva A., Ferreira A., Brandão F., Oliveira F. &
19 Lilenbaum W. 2012. Leptospirosis as the most frequent infectious disease impairing
20 productivity in small ruminants in Rio de Janeiro, Brazil. Trop. Anim. Health Prod.
21 44(4):773-777.
22
- 23 Martins G. & Lilenbaum W. 2014. Leptospirosis in sheep and goats under tropical conditions.
24 Trop. Anim. Health Prod. 46:11–17.
25
- 26 OIE. 2012. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 6th ed. Paris:
27 World Organization for Animal Health. 1343p.
28
- 29 Pimenta C.L.R.M., Castro V., Clementino I.J., Alves C.J., Fernandes L.G., Brasil A.W.L.,
30 Santos C.S.A.B. & Azevedo S.S. 2014. Leptospirose bovina no Estado da Paraíba:
31 prevalência e fatores de risco associados à ocorrência de propriedades positivas. Pesq. Vet.
32 Bras. 34(4):332-336.
33

- 1 Pugh D.G. & Baird A.N. 2012. *Sheep and goat medicine*. 2nd ed., Saunders, Maryland
 2 Heights. 621p.
 3
- 4 Santos J.P., Lima-Ribeiro A.M., Oliveira P.R., Santos M.P., Ferreira A.Jr., Medeiros A.A.
 5 & Tavares T.C. 2012. Seroprevalence and risk factors for Leptospirosis in goats in
 6 Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. *Trop. Anim. Health Prod.* 44:101-106.
 7
- 8 Silva R.C., Costa V.M., Shimabukuro F.H., Richini-Pereira V.B., Menozzi B.D. & Langoni
 9 H. 2012. Frequency of *Leptospira* spp. in sheep from Brazilian slaughterhouses and its
 10 association with epidemiological variables. *Pesq. Vet. Bras.* 32(3):194-198.
 11
- 12 Stoddard R.A., Gee J.E., Wilkins P.P., Mccaustland K. & Hoffmaster A.R. 2009. Detection of
 13 pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the
 14 *LipL32* gene. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 64:247–255.
 15
- 16 Vanasco N.B., Schmeling M.F., Lotterberger J., Costa F., Ko A.I. & Tarabla H.D. 2008.
 17 Clinical characteristics and risk factors of human leptospirosis in Argentina (1999-2005).
 18 *Acta Trop.* 107:255-258.

20 Legend of the Figures

21
 22 Fig. 1. Representation of the municipalities with the respective number of sampled animals in
 23 the Northeast semi-arid region, Brazil, during the period the 2013 and 2014.

24
 25 Fig. 2. Electrophoresis in agarose of the amplified DNA of urine samples (U) and renal tissue
 26 (TR) using the primer *LipL32* with Ladder (Ld) of 242pb and respective negative (NC) and
 27 positive (PC) controls.

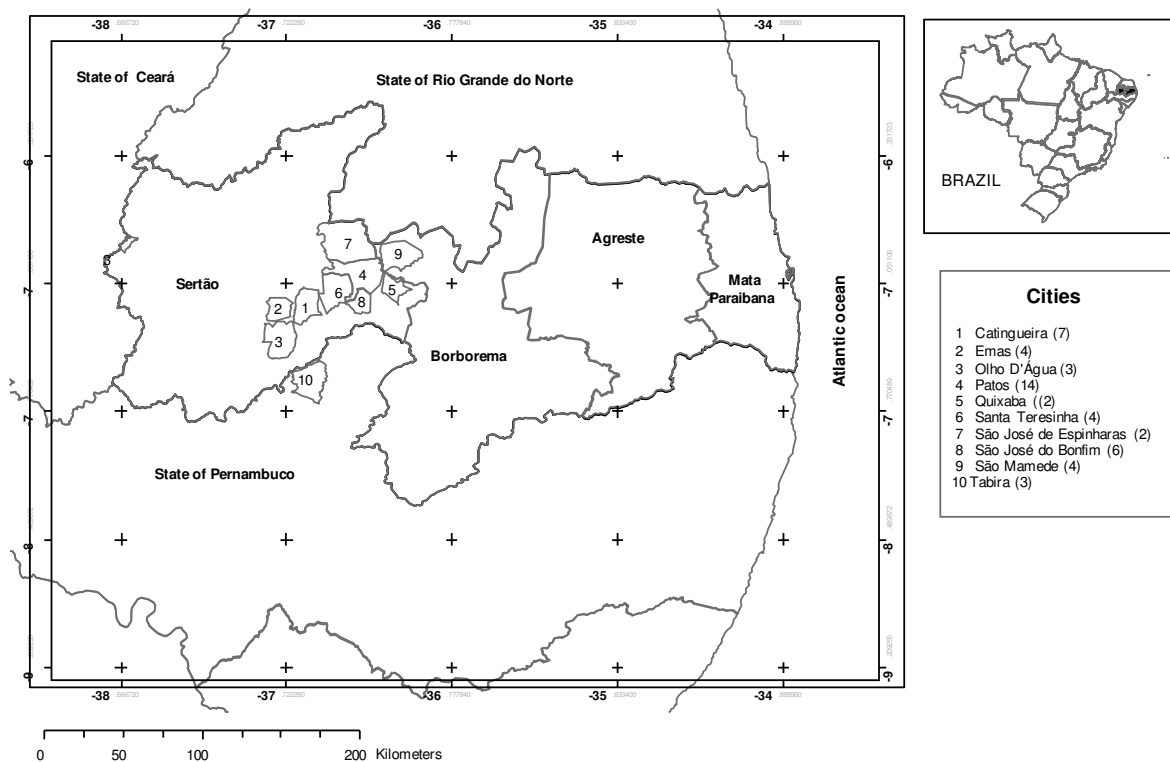
29 The tables

30
 31 **Table 1. Results of the serology, polymerase chain reaction (PCR) and bacterial culture,**
 32 **according to the origin of the animals**

Origin	Serology		PCR	Isolation
	Serovar	Title		

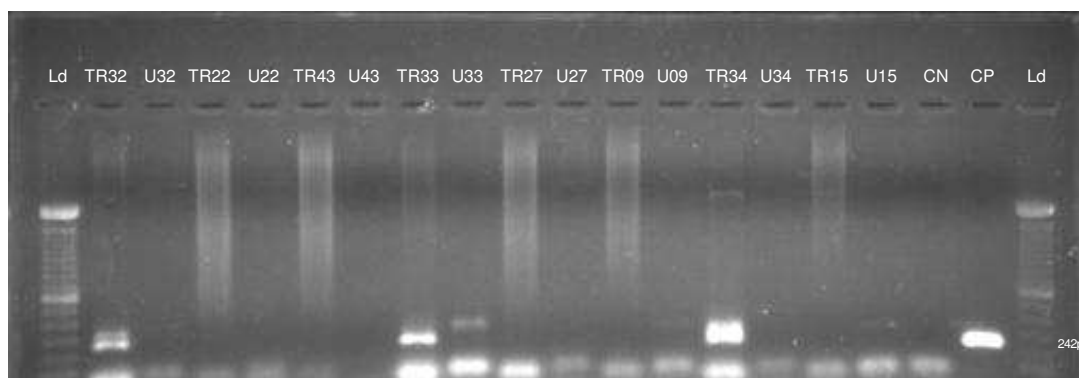
Patos	Autumnalis	100	-	-
São Mamede	Javanica	100	-	-
Tabira	Javanica	800	+	-
Tabira	Javanica	200	+	-
Tabira	-	-	+	-

1
2
3
4



5
6
7

Figure 1



8
9

Figure 2

ANEXO II

Normas do periódico Pesquisa Veterinária Brasileira

Os trabalhos para submissão devem ser enviados por via eletrônica, através do e-mail <jurgen.dobereiner@pvb.com.br>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word e formatados de acordo com o modelo de apresentação disponível no site da revista (www.pvb.com.br). Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista (www.pvb.com.br) e o modelo em Word (PDF no site). Os originais submetidos fora das normas de apresentação, serão devolvidos aos autores para a devida adequação.

Apesar de não serem aceitas comunicações (*Short communications*) sob forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo. Trabalhos sobre Anestesiologia e Cirurgia serão recebidos para submissão somente os da área de Animais Selvagens.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (*peer review*).

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista (impressa e online) e distribuição via correio é cobrada taxa de publicação (*page charge*) no valor de R\$ 250,00 por página editorada e impressa, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinação destes dois últimos), Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) o Título do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) Autor(es) deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científica, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes:

1 Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto P.V.; Franklin
2 Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F.; Silvana Maria
3 Medeiros de Sousa Silva poderia usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva S.M.M.S., ou
4 Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso, Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto, Silvana M.
5 Medeiros-Silva, e inverso, Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna
6 indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores;

7 c) o ABSTRACT deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em
8 português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos devem ser seguidos de
9 “INDEX TERMS” ou “TERMOS DE INDEXAÇÃO”, respectivamente;

10 d) o RESUMO deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado,
11 indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos
12 em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a
13 palavra RESUMO;

14 e) a INTRODUÇÃO deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma
15 assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

16 f) em MATERIAL E MÉTODOS devem ser reunidos os dados que permitam a repetição
17 do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a
18 aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

19 g) em RESULTADOS deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros
20 devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de
21 várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras),
22 ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

23 h) na DISCUSSÃO devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém
24 mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação
25 do autor e da revista de publicá-los;

26 i) as CONCLUSÕES devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

27 j) Agradecimentos devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de
28 rodapé;

29 k) a Lista de REFERÊNCIAS, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que
30 tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo
31 sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e
32 baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o
33 título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou
34 obra, usando as instruções do “Style Manual for Biological Journals” (American Institute for

1 Biological Sciences), o “Bibliographic Guide for Editors and Authors” (American Chemical
2 Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados (www.pvb.com.br).

3 2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:

4 a) os trabalhos devem ser submetidos seguindo o exemplo de apresentação de fascículos
5 recentes da revista e do modelo constante do site sob “Instruções aos Autores”
6 (www.pvb.com.br). A digitalização deve ser na fonte Cambria, corpo 10, entrelinha simples; a
7 página deve ser no formato A4, com 2cm de margens (superior, inferior, esquerda e direita), o
8 texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras
9 e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive gráficos) devem
10 ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho,
11 devem ser introduzidos através da ferramenta “Inserir” do Word; pois imagens copiadas e
12 coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má
13 qualidade;

14 b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no
15 passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números
16 arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa
17 numeração será contínua por todo o trabalho; as notas serão lançadas ao pé da página em que
18 estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão
19 mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que
20 possível, na ordem crescente destes. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em
21 um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

22 c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os
23 autores e o e-mail do autor para correspondência, bem como e-mails dos demais autores (para
24 eventualidades e confirmação de endereço para envio do fascículo impresso);

25 d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no
26 trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

27 e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; trabalhos de até três autores
28 serão citados pelos nomes dos três, e com mais de três, pelo nome do primeiro, seguido de “et
29 al.”, mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação
30 será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. Trabalhos não
31 consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da
32 respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Apud Fulano e o ano.)”; a referência do trabalho que
33 serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de
34 dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na

1 lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas
2 citações de trabalhos colocados entre parênteses, não se usará vírgula entre o nome do autor e
3 o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará
4 apenas por vírgulas, exememplo: (Christian & Tryphonas 1971, Priester & Haves 1974,
5 Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

6 f) a Lista das REFERÊNCIAS deverá ser apresentada isenta do uso de caixa alta, com os
7 nomes científicos em itálico (grifo), e sempre em conformidade com o padrão adotado nos
8 últimos fascículos da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

9 3. As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) originais devem ser
10 preferencialmente enviadas por via eletrônica. Quando as fotos forem obtidas através de
11 câmeras digitais (com extensão “jpg”), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem
12 tratamento ou alterações). Quando obtidas em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao
13 trabalho, mesmo se escaneadas pelo autor. Nesse caso, cada Figura será identificada na
14 margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor;
15 havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra
16 “pé”. Os gráficos devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem
17 fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área
18 da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas
19 preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos (“slides”). Para
20 evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

21 Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa,
22 somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

23 4. As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam
24 compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas , com independência do texto) e serão
25 apresentadas no final do trabalho.

26 5. Os Quadros deverão ser explicativos por si mesmos e colocados no final do texto. Cada um
27 terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo
28 do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para
29 grupamento de colunas. Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos,
30 recomeçando, se possível, com “a” em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do
31 Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.

ANEXO III

Normas do periódico Semina: Ciências Agrárias

Taxa de Submissão de novos artigos: R\$ 80,00. Em caso de rejeição do artigo, esta taxa não será devolvida.

A Taxa de Publicação (trabalhos aprovados) será de acordo com o número de páginas do manuscrito:

Até 9 páginas: R\$ 150,00

De 10 a 14 páginas: R\$ 200,00

De 15 a 19 páginas: R\$ 250,00

De 20 a 25 páginas: R\$ 300,00

Em caso de aceite do artigo para publicação, o valor pago de R\$ 80,00 referente à taxa de submissão, não será deduzido da taxa de publicação.

O comprovante de depósito deverá ser digitalizado e anexado no sistema como documento suplementar

Depósito em nome do Instituto de Tecnologia e Desenvolvimento Econômico e Social (ITEDES), CNPJ: 00.413.717/0001-65, em uma das três contas abaixo:

Banco do Brasil (001):

Agência: 1212-2

Conta corrente: 43509-0

Caixa Econômica Federal (104):

Agência: 3076

Conta corrente: 0033-4

Operação: 003

Itaú (341):

Agência: 3893

Conta corrente: 29567-9

Normas editoriais para publicação na Semina: Ciências Agrárias, UEL.

A partir de 01 de abril de 2014, os artigos poderão ser submetidos em português ou inglês, mas somente serão publicados em inglês. Os artigos submetidos em português, após o aceite, deverão ser obrigatoriamente traduzidos para o inglês.

1 Os artigos enviados para a revista até esta data e que estão em tramitação poderão ser
2 publicados em português, entretanto, se traduzidos para o inglês terão prioridade na
3 publicação.

4 Todos os artigos, após o aceite deverão estar acompanhados (como documento suplementar)
5 do comprovante de tradução ou correção de um dos seguintes tradutores:

6 American Journal Experts

7 Editage

8 Elsevier

9 <http://www.proof-reading-service.com>

10 <http://www.academic-editing-services.com/>

11 <http://www.publicase.com.br/formulario.asp>

12 O autor principal deverá anexar no sistema o documento comprobatório dessa correção na
13 página de submissão em “Docs. Sup.”

14 **OBSERVAÇÕES:**

15 1) Os manuscritos originais submetidos à avaliação são inicialmente apreciados pelo Comitê
16 Editorial da Semina: Ciências Agrárias. Nessa análise, são avaliados os requisitos de
17 qualidade para publicação na revista, como: escopo; adequação às normas da revista;
18 qualidade da redação; fundamentação teórica; atualização da revisão da literatura; coerência e
19 precisão da metodologia; contribuição dos resultados; discussão dos dados observados;
20 apresentação das tabelas e figuras; originalidade e consistência das conclusões. Se o número
21 de trabalhos com manuscrito ultrapassar a capacidade de análise e de publicação da Semina:
22 Ciências Agrárias é feita uma comparação entre as submissões, e são encaminhados para
23 assessoria Ad hoc, os trabalhos considerados com maior potencial de contribuição para o
24 avanço do conhecimento científico. Os trabalhos não aprovados nesses critérios são
25 arquivados e os demais são submetidos a análise de pelo menos dois assessores científicos,
26 especialistas da área técnica do artigo, sem a identificação do(s) autor(es). Os autores cujos
27 artigos forem arquivados, não terão direito à devolução da taxa de submissão.

28 2) Quando for o caso, deve ser informado que o projeto de pesquisa que originou o artigo foi
29 executado obedecendo às normas técnicas de biosegurança e ética sob a aprovação da
30 comissão de ética envolvendo seres humanos e/ou comissão de ética no uso de animais (nome
31 da Comissão, Instituição e nº do Processo).

32 **NÃO SERÃO ACEITOS MANUSCRITOS EM QUE:**

33 a) O arquivo do artigo anexado do trabalho contenha os nomes dos autores e respectiva
34 afiliação; b) Não tenha sido realizado o cadastro completo de todos os autores nos metadados

1 de submissão; Exemplo: Nome completo; Instituição/Afiliação; País; Resumo da
2 Biografia/Titulação/função

3

4 c) Não tenha sido incluído no campo COMENTÁRIOS PARA O EDITOR, um texto que
5 aponte a relevância do trabalho (importância e diferencial em relação a trabalhos já
6 existentes), em até 10 linhas;

7

8 d) Não estejam acompanhados de documento comprobatório da taxa de submissão, em
9 documento suplementar “Docs. Sup.” no ato da submissão;

10

11 e) Não estejam acompanhados dos seguintes documentos suplementares: gráficos,
12 figuras, fotos e outros, EM VERSÃO ORIGINAL. (Formato JPEG; TIFF; EXCEL)

13 f) Não constem no artigo original: título, resumo e palavras-chave em português e inglês,
14 tabelas e figuras.

15 RESTRIÇÃO POR ÁREA:

16 PARA A ÁREA DE AGRONOMIA NÃO SERÃO ACEITOS MANUSCRITOS EM QUE:

17 a) Os experimentos com cultura in vitro sejam limitados ao melhoramento dos protocolos já
18 padronizados ou que não forneçam novas informações na área;

19 b) Os experimentos de campo não incluam dados de pelo menos dois anos ou de várias
20 localidades dentro do mesmo ano;

21 c) Os experimentos se refiram apenas a testes sobre a eficiência de produtos comerciais
22 contra agentes bióticos, abióticos ou estresses fisiológicos;

23 d) Envolvam apenas bioensaios (screening) de eficácia de métodos de controle de insetos,
24 ácaros ou doenças de plantas, exceto se contiverem contribuição importante sobre
25 mecanismos de ação numa perspectiva de fronteira do conhecimento;

26 e) O objetivo seja limitado a registrar a ocorrência de espécies de pragas ou patógenos ou
27 associações entre hospedeiros em novas localidades dentro de regiões geográficas onde eles já
28 sejam conhecidos. Registros de espécies ou associações conhecidas só serão considerados em
29 novas zonas ecológicas. Os registros de distribuição devem se basear em ecossistemas, e não
30 em fronteiras políticas.

31 PARA A ÁREA DE VETERINÁRIA

32 a) A publicação de relatos de casos é restrita e somente serão selecionados para tramitação
33 àqueles de grande relevância ou ineditismo, com real contribuição ao avanço do
34 conhecimento para a área relacionada.

1 Categorias dos Trabalhos

2 a) Artigos científicos: no máximo 20 páginas incluindo figuras, tabelas e referências
3 bibliográficas;

4 b) Comunicações científicas: no máximo 12 páginas, com referências bibliográficas limitadas
5 a 16 citações e no máximo duas tabelas ou duas figuras ou uma tabela e uma figura;

6 b) Relatos de casos: No máximo 10 páginas, com referências bibliográficas limitadas a 12
7 citações e no máximo duas tabelas ou duas figuras ou uma tabela e uma figura;

8 c) Artigos de revisão: no máximo 25 páginas incluindo figuras, tabelas e referências
9 bibliográficas.

10 Apresentação dos Trabalhos

11 Os originais completos dos artigos, comunicações, relatos de casos e revisões podem ser
12 escritos em português ou inglês no editor de texto Word for Windows, em papel A4, com
13 numeração de linhas por página, espaçamento 1,5, fonte Times New Roman, tamanho 11
14 normal, com margens esquerda e direita de 2 cm e superior e inferior de 2 cm, respeitando-se
15 o número de páginas, devidamente numeradas no canto superior direito, de acordo com a
16 categoria do trabalho.

17 *Figuras (desenhos, gráficos e fotografias) e Tabelas* serão numeradas em algarismos arábicos
18 e devem ser incluídas no final do trabalho, imediatamente após as referências bibliográficas,
19 com suas respectivas chamadas no texto. Além disso, as figuras devem apresentar boa
20 qualidade e deverão ser anexadas nos seus formatos originais (JPEG, TIF, etc) em “Docs
21 Supl.” na página de submissão. Não serão aceitas figuras e tabelas fora das seguintes
22 especificações: Figuras e tabelas deverão ser apresentadas nas larguras de 8 ou 16 cm com
23 altura máxima de 22 cm, lembrando que se houver a necessidade de dimensões maiores, no
24 processo de editoração haverá redução para as referidas dimensões.

25 Observação: Para as tabelas e figuras em qualquer que seja a ilustração, o título deve figurar
26 na parte superior da mesma, seguida de seu número de ordem de ocorrência em algarismo
27 arábico, ponto e o respectivo título.

28 Indicar a fonte consultada abaixo da tabela ou figura (elemento obrigatório). Utilizar fonte
29 menor (Times New Roman 10).

30 Citar a autoria da fonte somente quando as tabelas ou figuras não forem do autor.

31 Ex: Fonte: IBGE (2014), ou Source: IBGE (2014).

32 Preparação dos manuscritos

33 Artigo científico:

1 Deve relatar resultados de pesquisa original das áreas afins, com a seguinte organização dos
2 tópicos: Título; Título em inglês; Resumo com Palavras-chave (no máximo seis palavras, em
3 ordem alfabética); Abstract com Key words (no máximo seis palavras, em ordem alfabética);
4 Introdução; Material e Métodos; Resultados e Discussão com as conclusões no final da
5 discussão ou Resultados; Discussão e Conclusões separadamente; Agradecimentos;
6 Fornecedores, quando houver e Referências Bibliográficas. Os tópicos devem ser destacados
7 em negrito, sem numeração, quando houver a necessidade de subitens dentro dos tópicos, os
8 mesmos devem ser destacados em itálico e se houver dentro do subitem mais divisões, essas
9 devem receber números arábicos. (Ex. Material e Métodos... *Áreas de estudo...1. Área*
10 *rural...2. Área urbana*).

11 O trabalho submetido não pode ter sido publicado em outra revista com o mesmo conteúdo,
12 exceto na forma de resumo em Eventos Científicos, Nota Prévia ou Formato Reduzido.

13 A apresentação do trabalho deve obedecer à seguinte ordem:

14 1. Título do trabalho, acompanhado de sua tradução para o inglês.

15 2. Resumo e Palavras-chave: Deve ser incluído um resumo informativo com um mínimo de
16 200 e um máximo de 400 palavras, na mesma língua que o artigo foi escrito, acompanhado de
17 sua tradução para o inglês (*Abstract e Key words*).

18 3. Introdução: Deverá ser concisa e conter revisão estritamente necessária à introdução do
19 tema e suporte para a metodologia e discussão.

20 4. Material e Métodos: Poderá ser apresentado de forma descritiva contínua ou com subitens,
21 de forma a permitir ao leitor a compreensão e reprodução da metodologia citada com auxílio
22 ou não de citações bibliográficas.

23 5. Resultados e Discussão: Devem ser apresentados de forma clara, com auxílio de tabelas,
24 gráficos e figuras, de modo a não deixar dúvidas ao leitor, quanto à autenticidade dos
25 resultados e pontos de vistas discutidos. Opcionalmente, as conclusões podem estar no final
26 da discussão.

27 6. Conclusões: Devem ser claras e de acordo com os objetivos propostos no trabalho.

28 7. Agradecimentos: As pessoas, instituições e empresas que contribuíram na realização do
29 trabalho deverão ser mencionadas no final do texto, antes do item Referências Bibliográficas.

30 Observações:

31 Notas: Notas referentes ao corpo do artigo devem ser indicadas com um símbolo sobrescrito,
32 imediatamente depois da frase a que diz respeito, como notas de rodapé no final da página.

1 Figuras: Quando indispensáveis figuras poderão ser aceitas e deverão ser assinaladas no texto
2 pelo seu número de ordem em algarismos arábicos. Se as ilustrações enviadas já foram
3 publicadas, mencionar a fonte e a permissão para reprodução.

4 Tabelas: As tabelas deverão ser acompanhadas de cabeçalho que permita compreender o
5 significado dos dados reunidos, sem necessidade de referência ao texto.

6 Grandezas, unidades e símbolos:

7 a) Os manuscritos devem obedecer aos critérios estabelecidos nos Códigos Internacionais de
8 cada área.

9 b) Utilizar o Sistema Internacional de Unidades em todo texto.

10 c) Utilizar o formato potência negativa para notar e inter-relacionar unidades, e.g.: kg ha⁻¹.
11 Não inter-relacione unidades usando a barra vertical, e.g.: kg/ha.

12 d) Utilizar um espaço simples entre as unidades, g L⁻¹, e não g.L⁻¹ ou gL⁻¹.

13 e) Usar o sistema horário de 24 h, com quatro dígitos para horas e minutos: 09h00, 18h30.

14 8. Citações dos autores no texto

15 Deverá seguir o sistema de chamada alfabética seguidas do ano de publicação de acordo com
16 os seguintes exemplos:

17 a) Os resultados de Dubey (2001) confirmaram que

18 b) De acordo com Santos et al. (1999), o efeito do nitrogênio.....

19 c) Beloti et al. (1999b) avaliaram a qualidade microbiológica.....

20 d) [...] e inibir o teste de formação de sincício (BRUCK et al., 1992).

21 e) [...]comprometendo a qualidade de seus derivados (AFONSO; VIANNI, 1995).

22 Citações com dois autores

23 Citações onde são mencionados dois autores, separar por ponto e vírgula quando estiverem
24 citados dentro dos parênteses.

25 Ex: (PINHEIRO; CAVALCANTI, 2000).

26 Quando os autores estiverem incluídos na sentença, utilizar o (e)

27 Ex: Pinheiro e Cavalcanti (2000).

28 Citações com mais de dois autores

29 Indicar o primeiro autor seguido da expressão et al.

30 Dentro do parêntese, separar por ponto e vírgula quando houver mais de uma referência.

31 Ex: (RUSSO et al., 2000) ou Russo et al. (2000); (RUSSO et al., 2000; FELIX et al., 2008).

32 Para citações de diversos documentos de um mesmo autor, publicados no mesmo ano, utilizar
33 o acréscimo de letras minúsculas, ordenados alfabeticamente após a data e sem
34 espacejamento.

1 Ex: (SILVA, 1999a, 1999b).

2 As citações indiretas de diversos documentos de um mesmo autor, publicados em anos
3 diferentes, separar as datas por vírgula.

4 Ex: (ANDRADE, 1999, 2000, 2002).

5 Para citações indiretas de vários documentos de diversos autores, mencionados
6 simultaneamente, devem figurar em ordem alfabética, separados por ponto e vírgula.

7 Ex: (BACARAT, 2008; RODRIGUES, 2003).

8 9. Referências: As referências, redigidas segundo a norma NBR 6023, ago. 2000, e
9 reformulação número 14.724 de 2011 da ABNT, deverão ser listadas na ordem alfabética no
10 final do artigo. Todos os autores participantes dos trabalhos deverão ser relacionados,
11 independentemente do número de participantes. A exatidão e adequação das referências a
12 trabalhos que tenham sido consultados e mencionados no texto do artigo, bem como opiniões,
13 conceitos e afirmações são da inteira responsabilidade dos autores.

14 Observação: Consultar os últimos fascículos publicados para mais detalhes de como fazer as
15 referências do artigo.

16 As outras categorias de trabalhos (Comunicação científica, Relato de caso e Revisão) deverão
17 seguir as mesmas normas acima citadas, porém, com as seguintes orientações adicionais para
18 cada caso:

19 Comunicação científica

20 Uma forma concisa, mas com descrição completa de uma pesquisa pontual ou em andamento
21 (nota prévia), com documentação bibliográfica e metodologias completas, como um artigo
22 científico regular. Deverá conter os seguintes tópicos: Título (português e inglês); Resumo
23 com Palavras-chave; Abstract com Key words; Corpo do trabalho sem divisão de tópicos,
24 porém seguindo a sequência - introdução, metodologia, resultados (podem ser incluídas
25 tabelas e figuras), discussão, conclusão e referências bibliográficas.

26 Relato de caso

27 Descrição sucinta de casos clínicos e patológicos, resultados inéditos, descrição de novas
28 espécies e estudos de ocorrência ou incidência de pragas, microrganismos ou parasitas de
29 interesse agrônomo, zootécnico ou veterinário. Deverá conter os seguintes tópicos: Título
30 (português e inglês); Resumo com Palavras-chave; Abstract com Key words; Introdução com
31 revisão da literatura; Relato do (s) caso (s), incluindo resultados, discussão e conclusão;
32 Referências Bibliográficas.

33 Artigo de revisão bibliográfica

1 Deve envolver temas relevantes dentro do escopo da revista. O número de artigos de revisão
2 por fascículo é limitado e os autores somente poderão apresentar artigos de interesse da
3 revista mediante convite de membro(s) do comitê editorial da Revista. No caso de envio
4 espontâneo do autor (es), é necessária a inclusão de resultados relevantes próprios ou do
5 grupo envolvido no artigo, com referências bibliográficas, demonstrando experiência e
6 conhecimento sobre o tema.

7 O artigo de revisão deverá conter os seguintes tópicos: Título (português e inglês); Resumo
8 com Palavras-chave; Abstract com Key words; Desenvolvimento do tema proposto (com
9 subdivisões em tópicos ou não); Conclusões ou Considerações Finais; Agradecimentos (se for
10 o caso) e Referências Bibliográficas.

11 Outras informações importantes

12 1. A publicação dos trabalhos depende de pareceres favoráveis da assessoria científica "*Ad*
13 *hoc*" e da aprovação do Comitê Editorial da Semina: Ciências Agrárias, UEL.

14 2. Não serão fornecidas separatas aos autores, uma vez que os fascículos estarão disponíveis
15 no endereço eletrônico da revista (<http://www.uel.br/revistas/uel>).

16 4. Transferência de direitos autorais: Os autores concordam com a transferência dos direitos
17 de publicação do referido artigo para a revista. A reprodução de artigos somente é permitida
18 com a citação da fonte e é proibido o uso comercial das informações.

19 5. As questões e problemas não previstos na presente norma serão dirimidos pelo Comitê
20 Editorial da área para a qual foi submetido o artigo para publicação.

21 6. *Numero de autores*: Não há limitação para número de autores, mas deverão fazer parte
22 como co-autores aquelas pessoas que efetivamente participaram do trabalho. Pessoas que
23 tiveram uma pequena participação no artigo deverão ser citadas no tópico de Agradecimentos,
24 bem como instituições que concederam bolsas e recursos financeiros.

25 Condições para submissão

26 Como parte do processo de submissão, os autores devem verificar a conformidade da
27 submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de
28 acordo com as normas serão rejeitadas e aos autores informados da decisão.

29 1. Os autores devem informar que a contribuição é original e inédita, e não está sendo
30 avaliada para publicação por outra revista; caso contrário, deve-se justificar em
31 "Comentários ao Editor".

32 2. Devem informar ainda que o material está corretamente formatado e que os
33 Documentos Suplementares estão anexados, ESTANDO CIENTE que a formatação

1 incorreta importará na SUSPENSÃO do processo de avaliação SEM AVALIAÇÃO
2 DE MÉRITO.

3 3. Devem ser preenchidos dados de autoria de todos os autores no campo
4 Metadados durante o processo de submissão.

5 Utilize o botão "incluir autor"

6 1. No passo seguinte preencher os metadados em inglês.

7 Para incluí-los, após salvar os dados de submissão em português, clicar em "editar
8 metadados" no topo da página - alterar o idioma para o inglês e inserir: título em inglês,
9 abstract e key words. Salvar e ir para o passo seguinte.

10 1. A identificação de autoria do trabalho deve ser removida do arquivo e da opção
11 Propriedades no Word, garantindo desta forma o critério de sigilo da revista, caso
12 submetido para avaliação por pares (ex.: artigos), conforme instruções disponíveis
13 em Assegurando a Avaliação Cega por Pares.

14 2. Os arquivos para submissão devem estar em formato Microsoft Word, OpenOffice ou
15 RTF (desde que não ultrapassem 2MB)

16 O texto deve estar em folha A4, com linhas numeradas, espaço 1,5; fonte Time New roman
17 de tamanho 11;

18 1. Atestar que foram seguidas todas as normas éticas, em caso de pesquisa com seres
19 vivos, estando de posse dos documentos comprobatórios de aprovação pela
20 comissão de ética envolvendo seres humanos e/ou comissão de ética no uso de
21 animais caso sejam solicitados.

22 2. Efetuar o pagamento da Taxa de Submissão de artigos e anexar o comprovante como
23 documento suplementar "Docs. Sup."

24 Declaração de Direito Autoral

25 Os Direitos Autorais para artigos publicados nesta revista são de direito do autor. Em virtude
26 da aparecerem nesta revista de acesso público, os artigos são de uso gratuito, com atribuições
27 próprias, em aplicações educacionais e não-comerciais.

28 A revista se reserva o direito de efetuar, nos originais, alterações de ordem normativa,
29 ortográfica e gramatical, com vistas a manter o padrão culto da língua e a credibilidade do
30 veículo. Respeitará, no entanto, o estilo de escrever dos autores.

31 Alterações, correções ou sugestões de ordem conceitual serão encaminhadas aos autores,
32 quando necessário.

33 As opiniões emitidas pelos autores dos artigos são de sua exclusiva responsabilidade.

34 Política de Privacidade:

- 1 Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços
- 2 prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a
- 3 terceiros.