

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
UNIDADE ACADÊMICA DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E SAÚDE ANIMAL

Denise Batista Nogueira

Contribuições para o diagnóstico e epidemiologia da leptospirose em ovinos criados em condições semiáridas

Patos/PB
2020

**DISSERTAÇÃO
PPGCSA/UFCCG**

**DENISE BATISTA NOGUEIRA /
CONTRIBUIÇÕES PARA O DIAGNÓSTICO
E EPIDEMIOLOGIA DA LEPTOSPIROSE EM
OVINOS CRIADOS EM CONDIÇÕES
SEMIÁRIDAS**

2020

DENISE BATISTA NOGUEIRA

Contribuições para o diagnóstico e epidemiologia da leptospirose em ovinos criados em condições semiáridas

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Saúde Animal, da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Saúde Animal.

Orientador: Professor Doutor Sérgio Santos de Azevedo

Patos/PB
2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSRT DA UFCG

N778c

Nogueira, Denise Batista

Contribuições para o diagnóstico e epidemiologia da leptospirose em ovinos criados em condições semiáridas / Denise Batista Nogueira. – Patos, 2020.

63f.: il. color.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Saúde Animal) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2020.

"Orientação: Prof. Dr. Sérgio Santos de Azevedo"

Referências.

1. Transmissão venérea.
2. Transmissão vertical.
3. Ponto de corte.
4. Portadores. I. Título.

CDU 614: 619


UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
UNIDADE ACADÊMICA DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E SAÚDE ANIMAL

DENISE BATISTA NOGUEIRA

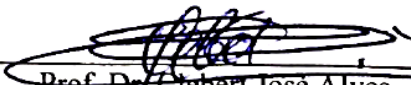
Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Saúde Animal da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Saúde Animal.

APROVADO EM 20/02/2020

EXAMINADORES:



Prof. Dr. Sérgio Santos de Azevedo
Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária/CSTR/UFCG
Presidente (Orientador)



Prof. Dr. Clebert José Alves
Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária/CSTR/UFCG
Membro Interno



Dr. Diego Figueiredo da Costa
Universidade Federal da Paraíba/UFPB
Membro Externo

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus, o autor da vida, por ter tornado os meus sonhos possíveis e ter me agraciado diariamente com suas bênçãos e livramentos. Tudo que tenho e o que sou devo ao Meu Pai, que me salvou e me sustenta a cada dia.

A minha família, por ter sido sempre a base para minha formação em quanto cidadã. Foi através de todos vocês que aprendi desde cedo à importância da educação e da dignidade. Agradeço em especial aos meus pais Gleide e Lucides pelas orações e amor. Aos meus tios, avós e primos por todo apoio nos momentos mais difíceis. Ao meu amado irmão Danilo por toda força, encorajamento e por ser um exemplo para mim.

Serei sempre grata ao meu mentor e orientador professor Sérgio, por toda confiança e dedicação, por ter me ensinado tanto e abrido portas para que muitos objetivos pudessem ser alcançados.

Aos professores Sérgio, Silvano, Clebert e Carol por serem verdadeiras inspirações para minha formação acadêmica. Agradeço por todo conhecimento transmitido e por todas as oportunidades que me foram dadas.

Agradeço a todos meus amigos do Laboratório de Doenças Transmissíveis (LDT) que tanto me ajudaram no andamento do projeto, Diego, Nathanael, Maira, Devede, Rafael, Juciê, Igor, Melissa, Camila, Flávia e Draenne. Sem vocês nada disso teria sido possível.

Serei sempre imensamente grata a todos do Laboratório de Biologia Molecular (LBM), especialmente Luana por toda imensurável ajuda em todas as análises moleculares do projeto e a professora Márcia por ceder o espaço.

As minhas grandes amigas Flávia e Camila, que além de toda ajuda durante a dissertação, se tornaram irmãs que Deus me presentou para tornar os dias difíceis mais leves. Sem vocês eu tenho certeza que nada disso teria se tornado possível. As minhas amigas Gisele e Brunna, por todos os conselhos e ajuda.

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

A minha amiga Ediane, com a qual compartilho um carinho enorme pela buiatria.

A minha grande amiga Rayra por ser tão inspiradora, sempre presente em meus dias e mesmo de longe me dá conforto e alegria nos dias bons e ruins.

As minhas queridas amigas Carla e Jesiane por todo carinho e longos anos de amizade que nunca deixou de existir, mesmo com a distância e o tempo.

As minhas migas e irmãs em Cristo, Paula, Vitória e Amanda. Vocês são especiais. Muito obrigada por tudo.

A dona Francinete por toda paciência, ajuda e conhecimento transmitido. Aos motoristas da UFCG e todos os demais funcionários, os quais realizam trabalhos imprescindíveis para que nós alunos, possamos realizar os projetos. Também agradeço a todos os funcionários do abatedouro público municipal de Patos, por toda a colaboração para que muitas pesquisas sejam realizadas neste local.

Aos funcionários Adalberto, Jonas e Adalgisa pela contribuição, por serem excelentes profissionais e tanto ajudar aos pós-graduandos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Saúde Animal e aos professores da UFCG. A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

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

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

RESUMO

Em regiões de clima semiárido existem fatores ambientais que são adversos à sobrevivência e propagação das leptospiros, assim o papel das peculiaridades nas rotas de transmissão que independem do ambiente precisam ser melhor investigadas. Dessa forma, buscou-se gerar contribuições para o diagnóstico e epidemiologia da infecção por *Leptospira* sp. em ovinos criados em condições semiáridas. No Capítulo I, descreveu um estudo a partir de 104 ovelhas fêmeas adultas amostradas durante o período seco e chuvoso, compreendidos entre os anos de 2018 e 2019. Coletou-se na linha de abate amostras de fluido vaginal, urina, bexiga, rim, útero, tuba uterina, ovário e placenta para posterior detecção molecular por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). As amostras de melhores reações foram amplificadas e submetidas ao sequenciamento genético. Para o cultivo bacteriológico, apenas fluido vaginal e urina foram utilizados, enquanto o sangue foi destinado à investigação sorológica por meio do teste de aglutinação microscópica (SAM). No total, foram detectados anticorpos anti-*Leptospira* sp. em 26 (25%) dos animais analisados pela SAM na diluição inicial 1:50, enquanto que 69 (66,3%) animais possuíam, no mínimo, um órgão/fluido com presença de DNA leptospiral. Das 758 amostras de órgãos/fluidos dos tratos genital e urinário, em 519 (68,5%) amostras havia presença de DNA. Na análise das variáveis estatísticas de cada tipo de material biológico entre período seco e chuvoso, apenas no fluido vaginal houve diferença significativa entre as proporções ($p < 0,001$), no qual o período seco se sobrepôs. Foi possível realizar o sequenciamento em nove amostras com 99% de similaridade à *L. interrogans* e isolamento em três amostras de fluido vaginal. E em três cultivos de fluido vaginal foram obtidos resultados positivos na PCR, indicando a recuperação de estirpes viáveis. No Capítulo II foi realizado um estudo para detectar a transmissão vertical de *Leptospira* sp. em fetos de ovinos abatidos no Semiárido Nordeste. Após abate das progenitoras, os conceitos foram retirados do ambiente uterino e conduzidos ao laboratório, onde foram necropsiados. Amostras de sangue das matrizes e dos fetos foram coletados para investigação da ocorrência de anticorpos anti-*Leptospira* sp. através da SAM. Para análise molecular através da PCR a partir dos conceitos, foram coletadas amostras do sistema nervoso central (SNC), pulmão, fígado, baço, conteúdo estomacal, líquido peritoneal, rim, bexiga, urina e sistema reprodutor e naqueles que estavam no início da formação, as amostras consistiram apenas em sistema nervoso central e macerado do tórax (ovóide córmico). Foram amostradas 23 progenitoras e destas, sete apresentaram anticorpos a partir do título 50. Em relação aos fetos, foram coletados 29, sendo dois (6,9%) soropositivos na titulação 10 para os sorogrupos Pyrogenes, Tarassovi e Autumnalis. Na PCR, 24 (82,7%) tiveram pelo menos um órgão positivo. De um total de 209 amostras, em 61 (29,2%) foi comprovada a presença de DNA leptospírico. O sequenciamento de DNA leptospírico foi possível em três amostras de fragmentos de rim, SNC e fígado com 99,3% similares a *L. interrogans*. Na análise macroscópica foram observados que três fetos possuíam múltiplas malformações.

PALAVRAS-CHAVE: Transmissão venérea; Transmissão vertical; Ponto de corte; Portadores.

ABSTRACT

In regions with a semiarid climate, there are environmental factors that are adverse to the survival and spread of leptospires, so the role of peculiarities in transmission routes that are independent of the environment needs to be further investigated. Thus, it sought to generate contributions to the diagnosis and epidemiology of infection by *Leptospira* sp. in sheep reared in semiarid conditions. In Chapter I, a study was described of 104 adult female sheep sampled during the dry and rainy period, between the years 2018 and 2019. Samples of vaginal fluid, urine, bladder, kidney, uterus, uterine tube, ovary and placenta were collected in the slaughter line for subsequent molecular detection through the polymerase chain reaction (PCR). The samples with the best reactions were amplified and subjected to genetic sequencing. For bacteriological culture, only vaginal fluid and urine were used, while the blood was destined for serological investigation through the microscopic agglutination test (SAM). In total, anti-*Leptospira* sp. in 26 (25%) of the animals analyzed by SAM in the initial 1:50 dilution, while 69 (66.3%) animals had at least one organ/fluid with the presence of leptospiral DNA. Of the 758 samples of organs/fluids from the genital and urinary tracts, in 519 (68.5%) samples there was DNA. In the analysis of the statistical variables of each type of biological material between dry and rainy periods, only in the vaginal fluid had a significant difference between the proportions ($p < 0.001$), in which the dry period overlapped. It was possible to perform the sequencing in nine samples with 99% similarity to *L. interrogans* and isolation in three samples of vaginal fluid. And in three cultures of vaginal fluid, positive results were obtained in PCR, indicating the recovery of viable strains. In Chapter II, a study was carried out to detect vertical transmission of *Leptospira* sp. in fetuses of sheep slaughtered in the Northeastern Semiarid. After slaughtering the progenitors, the fetuses were removed from the uterine environment and taken to the laboratory, where they were necropsied. Blood samples from the matrices and fetuses were collected to investigate the occurrence of anti-*Leptospira* sp. through SAM. For molecular analysis through PCR from the conceptuses, samples of the central nervous system (SNC), lung, liver, spleen, stomach contents, peritoneal fluid, kidney, bladder, urine and reproductive system were collected and from those who were at the beginning of formation, the samples consisted only of central nervous system and macerated chest (choroid ovoid). 23 progenitors were sampled and of these, seven showed antibodies from the title 50. Regarding the fetuses, 29 were collected, two (6.9%) of whom were seropositive in titration 10 for the serogroups Pyrogenes, Tarassovi and Autumnalis. In PCR, 24 (82.7%) had at least one positive organ. Of a total of 209 samples, 61 (29.2%) demonstrated the presence of leptospiric DNA. Leptospiric DNA sequencing was possible in three samples of kidney, CNS and liver fragments with 99.3% similar to *L. interrogans*. In macroscopic analysis, it was observed that three fetuses had multiple malformations.

KEY-WORDS: Venereal transmission; Vertical transmission; Cutoff; Carriers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

	Páginas
FIGURA 1. Árvore filogenética construída pelo método Neighbor-Joining e modelo Jukes- Cantor, bootstrap com 1.000 repetições. ▲ Amostra sequenciada.....	43

CAPÍTULO II

FIGURA 1. Árvore filogenética construída pelo método de vizinhança e modelo Jukes-Cantor, autoinicialização com 1.000 repetições. ▲ ■ Amostras sequenciadas.....	61
FIGURA 2. Feto malformado apresentando palatosquise, fissura labial e hidropsia.	61
FIGURA 3. Feto malformado apresentando artrogripose, micrognatia, palatosquise, queilosquise e escoliose.	62
FIGURA 4. Feto malformado apresentando consistência flácida no encéfalo, acúmulo de LCR, artrogripose, micrognatia, palatosquise e microftalmia.	62

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

	Páginas
TABELA 1. Sorogrupos mais frequentes e seus respectivos títulos de anticorpos em ovinos abatidos nos períodos seco e chuvoso.....	40
TABELA 2. Resultado da PCR em órgãos coletados nos períodos seco e chuvoso.....	41
TABELA 3. Resultado da PCR nos tratos reprodutivo e urinário nos períodos seco e chuvoso.....	41
TABELA 4. Número de animais positivos e negativos na PCR por material biológico e considerando qualquer material em cada ponto de corte (50 e 100) da SAM nos períodos seco e chuvoso.....	42
TABELA 5. Sensibilidade e especificidade (%) da SAM nos títulos 50 e 100 comparado ao PCR para material biológico e considerando qualquer material nos períodos seco e chuvoso.....	42

CAPÍTULO II

	Página
TABELA 1. Resultados da PCR em órgãos de fetos coletados no período seco e chuvoso no Nordeste do Brasil, 2018 e 2019	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CSTR	Centro de Saúde e Tecnologia Rural
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EMJH	Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INMET	Instituto Nacional de Meteorología do Brasil
MEC	Matriz Extracelular
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RIFI	Reação de Imunoflorescência Indireta
RNA	Ácido Ribonucléico
SAM	Soroaglutinação Microscópica
SNC	Sistema Nervoso Central
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
<	Menor
≤	Menor ou igual
μL	Microlitro
°C	Graus Celsius
Mg	Miligramma
mL	Mililitro
mm	Milímetro
<i>P</i>	Probabilidade
pH	Potencial Hidrogeniônico

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO GERAL	17
REFERÊNCIAS	19
CAPÍTULO I.....	22
Uso de técnicas sorológicas e moleculares para o diagnóstico de <i>Leptospira</i> sp. ovelhas carreadoras em condições semiáridas e a importância de rotas alternativas de transmissão	23
RESUMO	23
1.INTRODUÇÃO	24
2.MATERIAL E MÉTODOS	26
3.RESULTADOS	28
3.1. Detecção sorológica	28
3.2. Detecção molecular	28
3.3. Comparação da SAM com o diagnóstico molecular na detecção de animais carreadores	29
3.4 Cultivo bacteriológico	29
4.DISSCUSSÃO	29
5.CONCLUSÃO.....	33
REFERÊNCIAS.....	34
CAPÍTULO II.....	45
Transmissão vertical de <i>Leptospira</i> sp. em ovelhas abatidas em uma região de clima semiárido	46
RESUMO	46
1. Introdução	46
2. Material e Métodos.....	48
2.1. Desenho do estudo.....	48
2.2. Coleta das amostras	48
2.3. Teste de Soroaglutinação Microscópica (SAM)	49
2.4. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciamento	49
3. Resultados	50
4. Discussão	51

5. Conclusão.....	54
Referências	55
CONCLUSÃO GERAL.....	63

1 INTRODUÇÃO GERAL

2
3 A ovinocultura é uma atividade de grande importância para a subsistência, sustento
4 econômico e social de diversas famílias que vivem principalmente no meio rural,
5 representando uma garantia para a segurança alimentar, havendo um contingente nacional de
6 17.976.367 animais, sendo a maior concentração na região Nordeste (IBGE, 2017). Os
7 núcleos de ovinocultura representam um dos meios mais viáveis de convivência com a seca.
8 Esta atividade tem se desenvolvido acentuadamente no Brasil, porém os níveis de produção e
9 produtividade ainda não são capazes de atender as exigências e demandas de um mercado
10 moderno (SIMPLÍCIO, 2011; PUGH e BAIRD, 2012). Entre os diversos motivos e
11 empecilhos para o insatisfatório quadro, podem ser observados baixos desempenhos
12 reprodutivos. Neste ponto pode-se destacar o manejo sanitário incorreto ou muitas vezes
13 inexistente, gerando persistentes falhas reprodutivas, as quais estão associadas a causas
14 multifatoriais, podendo ter como etiologia infecções por agentes patogênicos, sendo a
15 leptospirose uma enfermidade frequente (SUEPAUL et al., 2011; LIBONATI et al., 2018). A
16 leptospirose está relacionada a abortamentos, natimortalidade, infertilidade e retenção
17 placentária, diminuindo a produtividade em animais de produção e conseqüentemente,
18 gerando perdas econômicas a nível nacional e global (FAINE et al., 1999; GIVENS, 2006).
19 Esta é uma doença negligenciada, sendo seus efeitos na pecuária frequentemente
20 subestimados, como foi demonstrado por Martins et al. (2012). Além disso, a leptospirose é
21 uma zoonose que representa maior risco para quem trabalha tendo contato com animais que
22 são possíveis fontes de infecção (AZEVEDO et al., 2004).

23 A patogênese da falha reprodutiva ainda não é totalmente entendida, no entanto sabe-se
24 que a presença de leptospirosas no útero de ruminantes infectados interfere na implantação do
25 embrião ou em outros eventos precoces da prenhez. A localização exata onde a infecção se
26 instala no trato genital de fêmeas não é conhecida, mas o DNA da bactéria neste sistema foi
27 detectado em pequenos ruminantes através de técnicas moleculares (LILENBAUM et al.,
28 2008; ARENT et al., 2013; LOUREIRO et al., 2017; COSTA et al., 2018; SILVA et al.,
29 2018), fomentando a associação entre leptospirosas no trato genital das fêmeas e o
30 comprometimento da eficiência reprodutiva (ELLIS, 1994; CERRI et al., 1996; FARINA et
31 al., 1996; GROOMS, 2006; LILENBAUM et al., 2008).

32 Contudo, a maioria dos estudos sobre a leptospirose em pequenos ruminantes trata-se de
33 pesquisas de prevalência e/ou analogia aos bovinos, havendo um déficit de pesquisas que
34 tenham como objetivo observações mais sólidas dos aspectos cruciais da leptospirose

35 particularmente em pequenos ruminantes, o que gera uma contribuição limitada para estudo e
36 entendimento desta doença (MARTINS e LILENBAUM, 2014). Esta menor quantidade de
37 pesquisas e informações sobre a leptospirose em ovinos, gera um desfalque para nossa região,
38 onde o maior contingente animal é formado justamente por pequenos ruminantes.

39 Na maior parte da região Nordeste, a temperatura é quente e o clima é semiárido, com
40 temperatura média de 27°C, e precipitação média anual de aproximadamente 500 mm.
41 Normalmente existem duas estações: uma chuvosa de fevereiro a maio e um longo período de
42 seca de junho a janeiro. Porém, as épocas de seca algumas vezes chegam a durar mais de um
43 ano, gerando balanço hídrico negativo (Batista et al., 2007). E neste contexto, é importante
44 ressaltar que para a sobrevivência das leptospiras no ambiente em regiões semiáridas, assim
45 como para os mecanismos de disseminação da doença, os índices pluviométricos devem se
46 encontrar no mínimo entre 500-550 mm (ALVES et al., 1996).

47 Assim como foram conduzidos por Alves et al. (2012), HIGINO e Azevedo (2014) e
48 COSTA et al. (2016), diversos inquéritos epidemiológicos foram realizados em pequenos
49 ruminantes em diferentes estados brasileiros, mostrando a situação epidemiológica da doença.
50 Tais pesquisas têm sido de suma importância a fim de manter vigilância epidemiológica para
51 monitorar a distribuição espacial dos sorovares de *Leptospira* sp. nas diversas regiões. E estes
52 estudos têm mostrado que mesmo em períodos de longa estiagem, a doença, ainda tem
53 mantido sua infecção nos animais em região de clima semiárido. Ainda neste contexto,
54 percebe-se a enorme relevância de pesquisadores utilizarem abatedouros como fonte de
55 pesquisa e ferramenta de vigilância para diversas doenças em animais de produção.

56 Neste sentido, para avançar sobre o tema leptospirose ovina é necessário investigar a
57 importância das diferentes formas de transmissão direta e indireta da infecção e a ocorrência
58 de animais que são portadores genitais e urinários do agente. Especialmente na região
59 Nordeste, onde o clima semiárido é caracterizado por poucas chuvas e altas temperaturas e
60 uma vez associado às peculiaridades e influências de fatores ambientais, oferecem condições
61 epidemiológicas únicas que precisam ser analisadas em uma conjuntura diferente dos outros
62 lugares do Brasil e do mundo.

63 A presente Dissertação é composta por dois capítulos. O Capítulo I é um artigo que será
64 publicado à revista Acta Tropica (JCR 2.629, Qualis A2), tendo por objetivo demonstrar
65 contribuições para a epidemiologia e diagnóstico da leptospirose em região semiárida através
66 da detecção sorológica, molecular e microbiológica de *Leptospira* sp. a partir de
67 órgãos/fluidos dos tratos reprodutivo e urinário de 104 animais fêmeas ovinas abatidas no

68 semiárido do Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil, as quais foram divididas igualmente
 69 em dois grupos para serem amostradas em períodos diferentes (seco e chuvoso), para analogia
 70 dos mesmos. No Capítulo II trata-se de um artigo que será submetido à revista *Microbial*
 71 *Pathogenesis* (JCR 2.581, Qualis B1), em que foi realizado um estudo para detectar a
 72 transmissão vertical de *Leptospira* sp. por meio de detecção sorológica e molecular em 29
 73 fetos ovinos provindos de matrizes abatidas no semiárido do Estado da Paraíba, Nordeste do
 74 Brasil

REFERÊNCIAS

ALVES, C. J.; VASCONCELLOS, S. A.; CAMARGO, C. R. A.; MORAIS, Z. M. Influência dos fatores ambientais sobre a proporção de caprinos soro-reatores para a leptospirose em cinco centros de criação do Estado da Paraíba, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 63, n. 2, p. 11-19, 1996.

ALVES, C. J.; ALCINO, J. F.; FARIAS, A. E. M.; HIGINO, S. S. S.; SANTOS, F. A.; AZEVEDO, S. S.; COSTA, D. F.; SANTOS, C. S. A. B. Caracterização epidemiológica e fatores de risco associados à leptospirose em ovinos deslançados do semiárido brasileiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 6, p. 523-528, 2012.

ARENT, Z.; FRIZZELL, C.; GILMORE, C.; MACKIE, D.; ELLIS, W. A. Isolation of *Leptospira* spp. from genital tract of sheep. **The Veterinary Record**, Northern Ireland, v. 173, n. 23, p. 582, 2013. doi:10.1136/vr.101969

AZEVEDO, S. S.; ALVES, C.J.; ANDRADE, J.S.L.; SANTOS, F.A.; FREITAS, T.D.; BATISTA, C. S.A. Isolation of *Leptospira* spp. from kidneys of sheep at slaughter. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.71, n.3, p.383-385, 2004.

BATISTA, J. S.; RIET-CORREA, F.; TEIXEIRA, M. M. G.; MADRUGA, C. R.; SIMÕES, S. D. V.; MAIA, T. F. Trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian semiarid: description of an outbreak and lesions in the nervous system. **Veterinary Parasitology**, Rio Grande do Norte, v.143, p. 174-181, 2007.

CERRI, D.; NUVOLONI, R.; EBANI, V.; PEDRINI, A.; MANI, P.; ANDREANI, E.; FARINA, R. *Leptospira interrogans* serovar hardjo in the kidneys and genital tracts of naturally infected sheep. **New Microbiologica**, Pisa, v. 19, n.2, p. 175-178, 1996.

COSTA, D. F.; SILVA, A. F.; FARIAS, A. E. M.; BRASIL, A. W. L.; SANTOS, F. A.; GUILHERME, R. F.; AZEVEDO, S. S.; ALVES, C. J. Estudo sorológico da infecção por *Leptospira* spp. em caprinos e ovinos abatidos no Estado da Paraíba, semiárido do Nordeste, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 2, p. 819-828, 2016.

COSTA, D. F.; SILVA, M. L. C. R.; MARTINS, G.; DANTAS, A. F. M.; MELO, M. A.; AZEVEDO, S. S.; LILENBAUM, W.; ALVES, C. J. Susceptibility among breeds of sheep experimentally infected with *Leptospira interrogans* Pomona serogroup. **Microbial Pathogenesis**. 2018; 122:79–83. doi: 10.1016/j.micpath.2018.06.017

ELLIS, W.A. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Belfast, v. 10, n. 3, p. 463-478, 1994.

FARINA, R.; CERRI, D.; RENZONI, G.; ANDREANI, E.; MANI, P.; EBANI, V.; PEDRINI, A.; NUVOLONI, R. *Leptospira interrogans* in the genital tract of sheep. Research on ewes and rams experimentally infected with serovar hardjo (hardjobovis). **New Microbiologica**, Pisa, v.19, n. 3, p. 235–242, 1996.

GIVENS, M. D. A clinical, evidence-based approach to infectious causes of infertility in beef cattle. **Theriogenology**, Auburn, v. 66, n. 3, p. 648–654, 2006.
doi:10.1016/j.theriogenology.2006.04.021

GROOMS, D. L. Reproductive losses caused by bovine viral diarrhoea virus and leptospirosis. **Theriogenology**, East Lansing, v. 66, n. 3, p. 624-628, 2006.

HIGINO, S. S. S.; AZEVEDO, S. S. Leptospirose em pequenos ruminantes: situação epidemiológica atual no Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 81, n. 1, p. 86-94, 2014.

IBGE. Pesquisa Pecuária Municipal 2017. Tabela 3939: efetivo dos rebanhos, por tipo de rebanho, 2008 a 2017. [Rio de Janeiro, 2017e]. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939>> Acesso em: 26 abr. 2019.

LILENBAUM, W.; VARGES, R.; BRANDÃO, F. Z.; CORTEZ, A.; SOUZA, S. O.; BRANDÃO, P. E.; RICHTZENHAIN, L. J.; VASCONCELLOS, S. A. Detection of *Leptospira* spp. in semen and vaginal fluids of goats and sheep by polymerase chain reaction. **Theriogenology**, Niteroi, v. 69, n. 7, p. 837-842, 2008.
doi: 10.1016/j.theriogenology.2007.10.027

LIBONATI, H. A.; SANTOS, G. B.; SOUZA, G. N.; BRANDÃO, F. Z.; LILENBAUM, W. Leptospirosis is strongly associated to estrus repetition on cattle. **Tropical Animal Health and Production**, Niterói, v.50, n. 7, p.1625-1629, 2018. doi: 10.1007/s11250-018-1604-9

LOUREIRO, A. P.; PESTANA, C. P.; MEDEIROS, M. A.; LILENBAUM, W. High frequency of leptospiral vaginal carriers among slaughtered cows. **Animal Reproduction Science**, Niteroi, v.78, p. 50-54, 2017. doi: 10.1016/j.anireprosci.2017.01.008

MARTINS, G.; PENNA, B.; HAMOND, C.; LEITE, R. C. K.; SILVA, A.; FERREIRA, A.; BRANDÃO, F.; OLIVEIRA, F.; LILENBAUM, W. Leptospirosis as the most frequent infectious disease impairing productivity in small ruminants in Rio de Janeiro, Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, Niteroi, v. 44, n. 4, p. 773-777, 2012.
doi: 10.1007/s11250-011-9964-4

MARTINS, G.; LILENBAUM, W. Leptospirosis in sheep and goats under tropical conditions. **Tropical Animal Health and Production**, Rio de Janeiro, v. 46, p. 11-17, 2014.
doi: 10.1007/s11250-013-0480-6

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

SILVA, A. F.; FARIAS, P. J. A.; SILVA, M. L. C. R.; ARAÚJO JÚNIOR, J. P.; MALOSSI, C. D.; ULLMANN, L. S.; COSTA, D. F.; HIGINO, S. S. S.; AZEVEDO, S. S.; ALVES, C. J. High frequency of genital carriers of *Leptospira* sp. in sheep slaughtered in the semi-arid region of northeastern Brazil. **Tropical Animal Health Production**, v. 51, n. 43, 2018. doi: 10.1007/s11250-018-1657-9

SIMPLÍCIO, A. A. Caprinocultura e Ovinocultura de corte no Brasil: pontos para reflexão. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, v. 17, n. 52, p. 27-36, 2011.

SUEPAUL, S. M.; CARRINGTON, C. V.; CAMPBELL, M.; BORDE, G.; ADESIYUN, A. A. Seroepidemiology of leptospirosis in livestock in Trinidad. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 43, n. 2, p. 367-375, 2011.

CAPÍTULO I:

Uso de técnicas sorológicas e moleculares para o diagnóstico de *Leptospira* sp. ovelhas carreadoras em condições semiáridas e a importância de rotas alternativas de transmissão

Denise Batista Nogueira, Flávia Teresa Ribeiro da Costa, Camila de Sousa Bezerra, Maria Luana Cristiny Rodrigues Silva, Diego Figueiredo da Costa, Maira Porto Viana, José Devede da Silva, João Pessoa Araújo Júnior, Camila Dantas Malossi, Leila Sabrina Ullmann, Clebert José Alves, Sérgio Santos de Azevedo

Artigo a ser submetido à revista Acta Tropica (JCR 2.629, Qualis A1)

Uso de técnicas sorológicas e moleculares para o diagnóstico de *Leptospira* sp. ovelhas carreadoras em condições semiáridas e a importância de rotas alternativas de transmissão

Denise Batista Nogueira¹, Flávia Teresa Ribeiro da Costa¹, Camila de Sousa Bezerra¹, Maria Luana Cristiny Rodrigues Silva¹, Diego Figueiredo da Costa¹, Maira Porto Viana¹, José Devede da Silva¹, João Pessoa Araújo Júnior², Camila Dantas Malossi², Leila Sabrina Ullmann², Clebert José Alves¹, Sérgio Santos de Azevedo^{1*}

¹ Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR), Av. Universitária, s/n, Santa Cecília, Patos, PB 58708-110, Brasil; ² Universidade Estadual Paulista (Unesp), Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro, s/n, campus de Botucatu, Botucatu, SP 18618-687, Brasil

* **Corresponding author:** Dr. Sérgio Santos de Azevedo, E-mail: sergio@vps.fmvz.usp.br

75 **RESUMO**

76 É possível que possam existir peculiaridades na epidemiologia da leptospirose em regiões de
77 clima Semiárido, onde o ambiente muitas vezes é adverso, possibilitando a existência de rotas
78 de transmissão alternativas, via venérea, como forma de sobrevivência aos fatores ambientais
79 desfavoráveis. O objetivo do trabalho foi gerar contribuições para o diagnóstico e
80 epidemiologia da infecção por *Leptospira* sp. em ovinos criados em clima semiárido,
81 utilizando técnicas sorológicas, moleculares e microbiológicas para diagnóstico em épocas
82 seca e chuvosa. O estudo foi realizado em uma região no semiárido brasileiro. Foram
83 amostradas 104 ovelhas fêmeas adultas, das quais foram coletados fluido vaginal, urina,
84 bexiga, rim, útero, tuba uterina, ovário e placenta para posterior detecção molecular por meio
85 da reação em cadeia da polimerase (PCR), sendo as duas primeiras amostras (fluido vaginal e
86 urina) também destinadas ao cultivo bacteriológico, além disso foi coletado sangue para
87 investigação sorológica por meio da SAM. Amostras com amplificação de DNA foram
88 submetidas a sequenciamento genético. No total, foram detectados anticorpos anti-*Leptospira*
89 sp. em 26 (25%) dos animais analisados pela SAM na diluição inicial 1:50, enquanto que 69
90 (66,3%) animais possuíam, no mínimo, um órgão/fluido com presença de DNA. No geral, foi
91 realizada PCR em 758 fragmentos de órgãos/fluidos dos tratos genital e urinário, sendo que
92 em 519 (68,5%) amostras havia presença de DNA. Em análise as variáveis estatísticas de cada
93 tipo de material biológico entre período seco e chuvoso, apenas no fluido vaginal houve
94 diferença significativa entre as proporções ($p < 0,001$), no qual o período seco se sobrepôs. Foi
95 possível realizar o sequenciamento em nove amostras com 99 % de similaridade à *L.*
96 *interrogans* e isolamento em três amostras de fluido vaginal. E em três cultivos de fluido
97 vaginal foi possível a recuperação de estirpes viáveis. Os resultados obtidos na detecção
98 molecular indicam um grande número de animais portadores de leptospirose no trato genital,
99 enfatizando a importância do sítio reprodutivo e o papel da fêmea na transmissão venérea.
100 Para a identificação sorológica dos portadores assintomáticos em condições semiáridas, o
101 título 50 foi mais eficaz em comparação com o título 100, normalmente empregado na
102 sorologia para leptospirose.

103 **PALAVRAS-CHAVE:** Leptospirose genital; PCR; portadores; transmissão venérea.

104 1. INTRODUÇÃO

105 A leptospirose é uma doença infecciosa causada por bactérias do gênero *Leptospira*, com
106 forte impacto econômico em animais de produção e de importância em saúde pública (Ellis,
107 2015). O agente é liberado e mantido no meio ambiente por diversos hospedeiros, como
108 animais silvestres, domésticos e sinantrópicos, sendo que os roedores são os principais
109 reservatórios (Faine et al., 1999; Vijayachari et al., 2008; Costa et al., 2015; De Oliveira et al.,
110 2016). Os animais domésticos podem se infectar e atuarem como fontes de infecção para
111 outros animais ou seres humanos, sendo que as principais vias de transmissão incluem o
112 contato direto ou indireto com urina, restos placentários, fluidos vaginais, contato venéreo e
113 infecção intrauterina, contribuindo para o endemismo da doença (Faine et al., 1999;
114 Lilenbaum et al., 2008). Os ovinos podem atuar como hospedeiros de manutenção
115 assintomáticos ou hospedeiros acidentais, apresentando a forma aguda e grave da doença
116 (Silva et al., 2007). Inquéritos sorológicos evidenciaram que a leptospirose em ovinos está
117 ligada comumente ao sorogrupo Sejroe, sendo este o maior responsável por perdas
118 reprodutivas e prejuízos econômicos na espécie (Faine et al., 1999; Ciceroni et al., 2000;
119 Hermann et al., 2004; Silva et al., 2007). Apesar disso, é uma doença negligenciada, sendo
120 seus efeitos na pecuária frequentemente subestimados, o que se torna preocupante
121 principalmente na região Nordeste do Brasil, onde a ovinocultura é uma das atividades mais
122 viáveis para geração de empregos e convívio do homem com a seca. Além disso, como
123 requisitos para consolidação da atividade na cadeia produtiva em nível nacional, o mercado
124 demonstra a importância de questões sanitárias e de biossegurança. Neste ponto, doenças da
125 esfera reprodutiva, a exemplo da leptospirose, tem enorme destaque (Suepaul et al., 2011;
126 Ellis, 2015).

127 Os relatos existentes sobre a presença de leptospiras no trato genital de vacas deram
128 início ao reconhecimento e maiores investigações sobre a importância deste sítio extra
129 urinário como local de infecção (Ellis et al., 1986). A transmissão direta pela via venérea, por
130 não depender do ambiente, é menos influenciada por fatores ambientais e de sazonalidade,
131 mantendo constante a incidência da infecção e conseqüentemente levando a situações de
132 endemia, a qual é de difícil controle (Adler e De La Peña, 2010; Ellis, 2015; Martins e
133 Lilenbaum, 2015). Alguns estudos indicaram a presença de DNA leptospiral em amostras de
134 líquido vaginal, sêmen e tecido uterino, enfatizando a influência do sítio extra renal por meio
135 da transmissão venérea e congênita em pequenos ruminantes (Lilenbaum et al., 2008; Director
136 et al., 2014a, 2014b; Silva et al., 2018). Apesar da passagem de leptospiras do macho para a
137 fêmea através desta rota ser bem definida (Magajevski et al., 2005), na forma reversa o papel
138 da matriz na transmissão ainda é incerto (Director et al., 2014b). Assim, estudos adicionais
139 sobre formas de sobrevivência frente a condições ambientais para a manutenção da
140 leptospirose, especialmente em cenários Semiáridos são de extrema necessidade (Costa et al.,
141 2017; Costa et al., 2018; Silva et al., 2018).

142 A infecção por *Leptospira* sp., determinada por sorologia, encontra-se difundida nas
143 diferentes espécies de ruminantes em regiões de clima semiárido no Nordeste Brasileiro
144 (Pimenta et al., 2019), indicando sobrevivência e disseminação do agente nesta região. Dadas
145 as particularidades da interação agente-hospedeiro, existe a necessidade de aprimorar as
146 técnicas de diagnóstico usadas. Em locais onde a leptospirose é endêmica, é comum a

147 existência de animais portadores assintomáticos que atuam como transmissores silenciosos,
148 causando grande impacto na epidemiologia da doença (Almeida et al., 2019), de maneira que
149 é relevante a padronização do ponto de corte utilizado na sorologia com o objetivo de
150 aumentar a sensibilidade e reduzir o número de resultados falso-negativos, principalmente em
151 regiões de baixa endemicidade, como a região Nordeste do Brasil. Neste contexto, vale
152 destacar que trabalhos recentes do nosso grupo de pesquisa evidenciaram maior resistência à
153 infecção própria dos ovinos, sobretudo em animais mestiços, que apresentaram período de
154 soroconversão muito curto, o que justifica a utilização de pontos de corte mais baixos (Costa
155 et al., 2017; Costa et al., 2018).

156 Um resultado negativo na sorologia não é uma condição que garante a ausência de
157 infecção (Magajevski et al., 2005; Silva et al., 2018; Pinna et al., 2018), pois mesmo do teste
158 de soroglutinação microscópica (SAM) sendo teste recomendado para o diagnóstico da
159 leptospirose, principalmente em nível de rebanho, a correlação entre a sorologia e a real
160 situação de portador muitas vezes é baixa, pois é comum animais infectados apresentarem
161 baixos títulos de anticorpos ou até mesmo anticorpos não detectáveis (Otaka et al., 2012).
162 Desta forma, a detecção direta do agente em diferentes sítios (fluido vaginal, sêmen, urina,
163 rins e outros órgãos) por métodos moleculares torna o diagnóstico mais confiável, sendo
164 capaz de identificar animais carreadores com resultado negativo na sorologia (Director et al.,
165 2014a; Gamage et al., 2011; Otaka et al., 2012; Silva et al., 2018).

166 A região Nordeste do Brasil é caracterizada por escassez de chuvas, acentuada
167 irregularidade espaço-temporal e longos períodos de estiagem, os quais contribuem para o
168 período de seca. Normalmente existem duas estações: uma chuvosa de fevereiro a maio e um
169 longo período de seca de junho a janeiro, com precipitação pluviométrica anual média inferior
170 a 800 mm, porém na região semiárida há registros de média inferior a 500 mm. A época de
171 seca algumas vezes chega a durar mais de um ano, gerando balanço hídrico negativo, sendo
172 somada a elevada radiação solar e altas taxas de evaporação, contribuindo para perda
173 significativa na disponibilidade hídrica no solo (Batista et al., 2007; Araújo, 2011). Neste
174 contexto, é importante ressaltar que leptospiros excretadas por animais podem sobreviver por
175 longos períodos no ambiente e se disseminar indiretamente, porém há uma forte dependência
176 da umidade, pH e matéria orgânica, e para isso, os índices pluviométricos devem se encontrar
177 no mínimo entre 500-550 mm (Alves et al., 1996), o que na maioria das vezes não ocorre nas
178 regiões semiáridas, onde há prevalência de fatores adversos. Porém, inquéritos sorológicos
179 têm mostrado que, mesmo em períodos de longa estiagem de chuva, a infecção tem se
180 mantido em animais do semiárido nordestino (Higino e Azevedo, 2014; Costa et al., 2016).
181 Vale destacar que as peculiaridades da vegetação existente, a Caatinga, bioma exclusivo do
182 semiárido brasileiro e com uma rica fauna silvestre, oferecem condições epidemiológicas
183 únicas que precisam ser analisadas em uma conjuntura diferente dos outros lugares do Brasil e
184 do mundo. Dessa maneira, o objetivo deste estudo foi gerar contribuições para o diagnóstico e
185 a epidemiologia da infecção por *Leptospira* sp. em ovinos criados em condições de clima
186 semiárido, utilizando técnicas sorológicas, moleculares e bacteriológicas para diagnóstico da
187 infecção em épocas seca e chuvosa.

188 2. MATERIAL E MÉTODOS

189 O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Saúde e
190 Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande, com protocolo nº 100-2018.

191 Esta pesquisa foi conduzida no Abatedouro Público Municipal de Patos (Latitude: 07°
192 01' 28" S; Longitude: 37° 16' 48" W), semiárido do estado da Paraíba, Nordeste do Brasil. As
193 coletas foram realizadas no período de setembro a novembro de 2018 e de março a maio de
194 2019, os quais corresponderam, respectivamente, aos períodos seco e chuvoso.

195 Para determinar o tamanho mínimo da amostra em cada estação, foi utilizada a
196 seguinte fórmula para comparar as duas proporções (Dohoo et al., 2003):

$$n = \frac{[z_{\alpha/2} \times \sqrt{p_1 \times q_1 + p_2 \times q_2} + z_{1-\beta} \times \sqrt{p_1 \times q_1 + p_2 \times q_2}]^2}{(p_1 - p_2)^2}$$

197

198 onde,

199 n = tamanho mínimo da amostra

200 $Z_{\alpha/2}$ = 1.96 (valor de Z necessário para o nível de confiança de 95%)

201 $Z_{1-\beta}$ = 1.64 (valor de Z necessário para a potência de 95%)

202 p_1 = 0.474 (estimativa da proporção na estação chuvosa) (Martins et al., 2012a)

203 p_2 = 0.112 (estimativa da proporção na estação seca) (Costa et al., 2016)

204 q_1 = 1 - p_1

205 q_2 = 1 - p_2

206

207 De acordo com esses parâmetros, foram necessários 39 animais para cada estação, no
208 entanto, 52 animais foram selecionados, todos fêmeas e em idade adulta. Os dados
209 pluviométricos das estações meteorológicas da região indicaram que durante o período seco
210 houve precipitação acumulada de 31.2 mm durante os três meses de coleta, e no período
211 chuvoso a precipitação foi quase dez vezes superior, compreendendo pluviometria acumulada
212 de 306.9 mm, segundo dados do Instituto Nacional de Meteorologia do Brasil (INMET)
213 (INMET, 2019).

214 Amostras de sangue foram coletadas na linha de abate durante a sangria dos animais,
215 utilizando-se tubos estéreis com ativador de coagulação e capacidade para 8 mL devidamente
216 identificados. Em seguida, foram conduzidos ao laboratório, onde foram centrifugados à 3000
217 rpm durante dez minutos e as amostras de soro armazenadas em microtubos e congeladas a -
218 20 °C.

219 Para a detecção direta de *Leptospira* sp. nos sítios de infecção renal e extra renal foram
220 coletados fragmentos de rim, bexiga, ovário, útero, tuba uterina e placenta (em caso de
221 animais prenhes) de cada animal. Estes eram imediatamente fragmentados e colocados na
222 quantidade aproximada de dois gramas (em duplicatas) em microtubos livres de DNA e RNA
223 e armazenados a -20 °C para posterior detecção molecular. Além dos órgãos, também foi
224 coletado fluido vaginal com suabes estéreis diretamente da região cérvico-vaginal e urina por
225 cistocentese durante a evisceração, usando-se seringas estéreis de 5 mL. Ambos foram
226 igualmente armazenados em duplicatas em microtubos livres de DNA e RNA, sendo os
227 suabes adicionados à meio mL de PBS para conservar e estabilizar as proteínas. Além disso,
228 estes dois fluidos foram cultivados em meio específico.

229 Para tentativa de recuperação de estirpes de leptospiros, imediatamente após a coleta,
230 três gotas de urina foram semeadas e o suabe com fluido vaginal foi imerso em cultivo na
231 concentração de 10% em meio EMJH semi-sólido (Difco, BD Franklin Lakes, NJ, USA)
232 acrescentado de anfotericina B (0,05 mg/mL), 5-fluororacil (01mg/mL), fosfomicina (04
233 mg/mL), trimetoprim (0,2 mg/mL) e sulfametoxazol (0,4 mg/mL) para evitar a proliferação
234 de microrganismos indesejáveis (Chakraborty et al., 2011). Após 24 horas, 1 mL do cultivo
235 primário foi semeado em meio EMJH adicionado na proporção de 10% sem antibióticos,
236 com incubação subsequente a 30°C. Os tubos foram examinados semanalmente por 12
237 semanas usando microscopia de campo escuro.

238 A detecção de anticorpos anti-*Leptospira* sp. foi feita com o teste de aglutinação
239 microscópica (SAM), usando uma coleção de 24 sorovares pertencentes a 17 diferentes
240 sorogrupos patogênicos de cinco espécies: *L. interrogans*: sorovares Copenhageni, Canicola,
241 Autumnalis, Wolffi, Hardjoprajitno, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Kennewicki,
242 Hebdomadis, Pyrogenes, Bratislava e Australis; *L. santarosai*: sorovares Guaricura, Shermani
243 e Canalzoni; *L. borgpetersenii* sorovares Javanica, Tarassovi, Ballum, Mini e Castellonis; *L.*
244 *kirschneri* sorovares Grippytyphosa e Cynopteri; *L. noguchi* sorovares Panama e Lousiana
245 (OIE, 2014). A triagem foi realizada com título 50 e amostras aglutinantes foram submetidas
246 à titulação seriada em razão de dois. O título mais alto obtido foi considerado para
247 identificar o sorogrupo infectante.

248 O DNA foi extraído dos tecidos, fluido vaginal e urina usando o Kit Dneasy Blood and
249 Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany), seguindo as recomendações do fabricante. A reação
250 em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada conforme descrito anteriormente (Hamond et al.,
251 2014). Os primers *LipL32-45F* (5'-AAG CAT TAC CGC TTG TGG TG-3') and *Lip L32-*
252 *286R* (5'-GAA CTC CCA TTT CAG CGA TT-3'), assim como proposto anteriormente por
253 Stoddard et al. (2009), foram utilizados para amplificar o gene *LipL32*, específico para
254 leptospiros patogênicos. O sorogrupo *L. interrogans* Pomona sorovar Kennewicki foi utilizado
255 como controle positivo e a água ultrapura como controle negativo. A mesma metodologia foi
256 seguida para a extração de DNA nos cultivos de fluido vaginal e urina em EMJH semissólido
257 que apresentaram microrganismos sugestivos na leitura ao microscópio.

258 As reações de sequenciamento foram realizadas usando os iniciadores *LipL32-45F* e
259 *LipL32-286R* (Stoddard et al., 2009) com o Kit de Sequenciamento Big Dye Terminator v3.1
260 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Para eletroforese capilar, foram utilizados um
261 Analisador Genético 3130xl e polímero POP-7 (Platt et al., 2007). O alinhamento da
262 sequência foi realizado usando o BioEdit (Gouy et al., 2010), enquanto as sequências do
263 conjunto de dados foram obtidas no GenBank (Centro Nacional de Informações sobre
264 Biotecnologia, Bethesda, MD, EUA) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), usando a ferramenta
265 BLAST <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. A análise filogenética foi realizada usando o
266 pacote de software Seaview4 (Hall, 1999), e a árvore filogenética foi construída usando o
267 modelo de associação de vizinhos, com um valor de bootstrap de 1000 repetições
268 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>, visualizado através do FigTree v1.4.3
269 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>)). A reconstrução filogenética incluiu sequências de *Leptospiras* para
270 comparação.

271 Para a comparação da proporção de animais/amostras positivos entre os períodos seco
272 e chuvoso foi utilizado o teste do qui-quadrado com correção de continuidade de Yates ou
273 teste exato de Fisher, usando o software BioEstat 5.3 (Ayres et al., 2007), considerando nível
274 de significância de 0,05. Para a comparação dos resultados da sorologia com os da PCR
275 (considerando positividade por material biológico e qualquer material) foram calculadas
276 sensibilidade e especificidade com o programa Dag Stat (Mackinnon, 2000), considerando
277 como pontos de corte os títulos 50 e 100.

278 3. RESULTADOS

279 3.1. Detecção sorológica

280 No total, dos 104 animais foram detectados anticorpos anti-*Leptospira* em 12 (11,5%),
281 considerando ponto de corte o título 100, enquanto que, considerando título 50 como ponto de
282 corte, 26 (25%) animais foram reativos. Neste título, os sorogrupos detectados foram
283 Pyrogenes (34,6%), Icterohaemorrhagiae (19,2%), Ballum (15,4%), Pomona (11,5%) e
284 Autumnalis, Javanica, Australis, Tarasovi e Grippotyphosa com 3,8%. Enquanto no título
285 100, apenas os sorogrupos Pyrogenes, Icterohaemorrhagiae, Ballum, Pomona, Tarasovi e
286 Grippotyphosa foram reativos (Tabela 1).

287 Das 52 ovelhas do período seco, 12 (23,1%) foram sororeativas. O sorogrupo mais
288 comum foi o Icterohaemorrhagiae com cinco (41,7%) animais reagentes e maior título (1600),
289 seguido dos sorogrupos Pomona, com três reações (25%) e Tarassovi, Javanica, Australis e
290 Autumnalis, com uma reação cada (8,3%). Em relação ao período chuvoso, 14 (26,9%)
291 animais foram sororeativos e três sorogrupos foram detectados, sendo o mais comum
292 Pyrogenes com nove (64,3%) reações, seguido por Ballum com quatro (28,6%) e
293 Grippotyphosa com uma (7,1%), e o maior título detectado foi 100. Não houve diferença
294 estatística entre as proporções de animais sororeativos nos dois períodos ($P = 0,821$).

295 3.2. Detecção molecular

296 Dos 104 animais, 69 (66,3%) foram positivos na PCR, sendo 40 (58%) no período seco e 29
297 (42%) no período chuvoso. Os resultados da PCR foram organizados por trato (reprodutivo e
298 urinário) e por material biológico (fluido vaginal, urina, útero, ovário, tuba uterina, rim,
299 bexiga e placenta), sendo estes analisados no contexto geral com 104 animais e por período
300 (seco e chuvoso), com 52 animais em cada período. No total, foi realizada PCR em 758
301 fragmentos de órgãos/fluidos dos tratos genital e urinário dos 104 animais, sendo que em 237
302 (31,3%) órgãos/fluidos havia presença de DNA de *Leptospira* sp.

303 Em relação a cada material biológico no período seco, a ordem decrescente dos
304 órgãos/fluidos com maior frequência de positivos foi placenta oito (80%), fluido vaginal 24
305 (46,2%), tuba uterina 22 (42,3%), rim 20 (38,5%), útero 19 (36,5%), bexiga 15 (28,8%), urina
306 14 (26,9%) e ovário 13 (25%) (Tabela 2). No período chuvoso as frequências foram: placenta
307 10 (50%), útero 21 (40,4%), ovário 17 (32,7%), bexiga e tuba uterina ambos com 15 (28,8%),
308 rim 12 (23,1%), fluido vaginal e urina ambos com seis (11,5%). Foi observada diferença
309 estatística entre os períodos seco e chuvoso com relação à proporção de positividade no fluido
310 vaginal ($P < 0,001$).

311 Analisando as amostras por período (Tabela 3), foi observado que das 374 amostras do
312 período seco, 135 (36,1%) foram positivas, e das 384 do período chuvoso 102 (26,6%) foram
313 positivas ($P \leq 0,05$). Considerando os tratos reprodutivo e urinário separadamente 86
314 amostras (39,4%) do trato reprodutivo no período seco e 69 (30,3%) no período chuvoso
315 foram positivas ($P \leq 0,05$), bem como 49 (31,4%) amostras do trato urinário no período seco e
316 33 (21,2%) no período chuvoso foram positivas ($P \leq 0,05$). Por outro lado, não foi observada
317 diferença estatística entre as proporções de amostras positivas dos tratos reprodutivo e
318 urinário por período.

319 O sequenciamento de DNA diretamente dos produtos da PCR foi possível em duas
320 amostras de bexiga, duas de tuba uterina, duas de placenta, uma de útero, uma de urina e em
321 uma de rim. Em todas as amostras houve 99% de similaridade com *L. interrogans* (Figura 1).

322 **3.3. Comparação da SAM com o diagnóstico molecular na detecção de animais** 323 **carreadores**

324 Nas Tabelas 4 e 5 são apresentados os números de animais positivos e negativos na PCR por
325 material biológico e considerando qualquer material em cada ponto de corte (50 e 100) da
326 SAM, nos períodos seco e chuvoso, bem como sensibilidade e especificidade da SAM nos
327 títulos 50 e 100 em comparação com a PCR. Foi verificado que, independente do material
328 biológico utilizado na PCR e do período (seco ou chuvoso), os maiores valores de
329 sensibilidade da SAM foram obtidos com título 50, com exceção do suabe vaginal no período
330 chuvoso, em que as sensibilidades para os dois títulos foram iguais (16,7%).

331 **3.4 Cultivo bacteriológico**

332 Foram mantidos 208 cultivos em EMJH por 12 semanas, havendo crescimento sugestivo em
333 37 cultivos. Em três cultivos de fluido vaginal foi detectado DNA de *Leptospira* sp.,
334 confirmando assim a recuperação do agente nestes cultivos.

335 **4. DISCUSSÃO**

336 Não foi observada diferença estatística na proporção de animais sororeativos nos dois
337 períodos, no entanto, houve uma notável diferença nos sorogrupos detectados e respectivos
338 títulos de anticorpos, em que no período seco foram identificados seis sorogrupos com títulos
339 que variaram de 50 até 1600, e três sorogrupos detectados no período chuvoso com títulos
340 máximos de 100. A maior variedade de sorogrupos infectantes no período seco significa que
341 havia maior variação de estirpes circulantes nos animais, podendo ter relação com a alta
342 frequência de animais PCR-positivos no fluido vaginal neste mesmo período, ou seja, a
343 transmissão venérea pode ter influenciado para este cenário, demonstrando assim o
344 significativo papel da transmissão intraespécie no período seco. Associando estes achados a
345 possíveis fatores de risco presentes na região, ressalte-se que não é usual a utilização de
346 manejo reprodutivo/sanitário nas criações de ovinos (Santos et al., 2011), o que pode
347 predispor à ocorrência de doenças reprodutivas nos rebanhos. Outro aspecto que merece
348 destaque é que, durante o período de escassez de chuvas, em que os pastos encontram-se sem

349 disponibilidade de volumosos, a única fonte alimentar dos animais é a suplementação com
350 rações comerciais, as quais são armazenadas em galpões, locais que geralmente não são
351 devidamente higienizados e por ter alimentos, torna-se atrativo para roedores, que podem
352 contaminar os alimentos com urina (Matias et al., 2002), o que pode justificar a
353 predominância do sorogrupo *Icterohaemorrhagiae*. Inclusive a presença de roedores como
354 fator de risco associado à leptospirose em caprinos do Semiárido brasileiro foi demonstrada
355 (Higino et al., 2013).

356 Além disso, outro roedor silvestre bastante comum no semiárido, que também se
357 destaca como importante reservatório deste sorogrupo, é o preá (*Cavia aperea*) (Cubas et al.,
358 2007). Na espécie ovina, este sorogrupo indica infecção acidental, sendo o mesmo carreado e
359 liberado pelos animais domésticos e de vida livre, além de ter maior dependência dos fatores
360 ambientais externos e da presença de animais de outras espécies hospedeiras (Ellis, 2015).
361 Nestes casos é comum ocorrer a síndrome da leptospirose aguda com ocorrência de surtos
362 (Adler e De La Peña, 2010; Suepaul et al., 2011; Martins et al., 2012b; Giangaspero et al.,
363 2013). Além disso, sorovares pertencentes ao sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* possuem alto
364 potencial zoonótico, sendo patogênico para o homem, determinando diversas formas de
365 apresentação clínica e estando relacionados com os casos mais graves (Brasil, 2014).

366 O sorogrupo Pomona foi o segundo mais frequente no período de estiagem, sendo este
367 comumente encontrado em suínos sem sintomatologia clínica (Adler e De La Peña, 2010;
368 Romero-Vivas et al., 2013), porém em ovinos é uma cepa causadora de infecção acidental
369 estando ligada a doença aguda (Vermunt et al., 1994). No entanto, em uma recente pesquisa
370 que analisou ovinos infectados experimentalmente, apesar de ter obtido resultados positivos
371 na sorologia e na detecção molecular, não houve alterações nos achados anatomopatológicos e
372 histopatológicos, nem mesmo manifestações clínicas, ressaltando a resistência dos ovinos
373 criados na região semiárida à infecção (Costa et al., 2018).

374 A presença do sorogrupo Autumnalis, por mais que tenha sido em menor frequência,
375 causa preocupação, pois esta sorovariedade até então não está contida nas vacinas. Este
376 achado reforça ainda mais a importância de pesquisas continuadas no desenvolvimento de
377 novas vacinas contra a leptospirose e a necessidade da inclusão de novos sorovares (Higino et
378 al., 2010). Além disso, os reservatórios deste sorogrupo são os roedores (Faine et al., 1999). O
379 sorogrupo Autumnalis também tem sido considerado adaptado aos ovinos (Alves et al., 2012)
380 tendo destaque como o mais frequente em pesquisas a partir desta espécie, com
381 respectivamente 26,9% 10,9% e 49,3% de prevalência (Alves et al., 2012; Higino et al., 2013;
382 Pimenta et al., 2019). Em outra pesquisa a detecção deste sorogrupo em criações de ovinos
383 estava relacionada ao manejo dos animais, gerando uma fonte comum a todo o rebanho
384 (Escócio et al., 2010).

385 Os três últimos sorogrupos do período seco (*Javanica*, *Australis* e *Tarassovi*) também
386 são sorovariedades mantidas por animais silvestres. O sorogrupo *Javanica*, apesar de ter sido
387 detectado em ovinos (Silva et al., 2007; Costa et al., 2017), é relatado principalmente em
388 roedores domésticos e selvagens, em especial *Rattus norvegicus* (Natarajaseenivasan e
389 Ratnam, 1999). O sorogrupo *Australis* foi detectado em quatro diferentes espécies de
390 mamíferos silvestres mantidos em zoológico, enquanto que o sorogrupo *Tarassovi* em nove
391 (Lenharo et al., 2012).

392 O sorogrupo Ballum, detectado em quatro animais neste estudo, embora menos
393 comum nas pesquisas realizadas no Brasil, foi o mais frequente na espécie ovina em pesquisa
394 realizada em diferentes abatedouros no estado da Paraíba (Costa et al., 2016). Seus principais
395 reservatórios na natureza também são os pequenos camundongos ou ratos domésticos (Bharti
396 et al., 2003), os quais eliminam intermitentemente leptospiras no ambiente por meio da urina
397 (Silva et al., 2010). Esta sorovariedade foi detectada em rebanho de ovinos e caprinos [58]. O
398 sorogrupo Grippotyphosa, identificado em apenas um animal desta pesquisa, foi relatado em
399 animais silvestres, como guaxinins americanos (*Procyon lotor*) (Mitchell et al., 1999) e entre
400 os mustelídeos, os furões (*Galictis cuja*) (Gobel, 2001), demonstrando a importância dos
401 animais de vida livre na epidemiologia desta sorovariedade.

402 O resultado da sorologia referente ao período chuvoso enfatiza a importância dos
403 animais silvestres na transmissão interespecie e na epidemiologia da infecção como
404 reservatórios do agente, atuando como fontes de infecções para os animais domésticos e o
405 homem (Alves et al., 2004). No período chuvoso o sorogrupo Pyrogenes, presente em nove
406 animais, tem como hospedeiro natural animais silvestres (Santa Rosa et al., 1975), porém esse
407 sorogrupo foi detectado em inquéritos sorológicos realizados em ovinos, bovinos e caprinos
408 no Brasil (Favero et al., 2002; Castro et al., 2008; Escócio et al., 2010; Hermann et al., 2004;
409 Campos et al., 2017; Pimenta et al., 2019), podendo caracterizar infecção acidental. O
410 resultado sorológico do período seco evidencia a transmissão intraespecie, em que os ovinos
411 uma vez infectados, transmitiram o agente para os demais da mesma espécie, mesmo em
412 casos de infecção por sorogrupos acidentais advindos de animais sinantrópicos, a exemplo do
413 Icterohaemorrhagiae.

414 Não houve diferença estatística nos dois períodos entre as positivities na PCR nos
415 tratos urinário e reprodutivo, indicando igual importância de carreadores nos dois tratos. No
416 entanto foi verificada diferença estatística considerando o total de amostras, com maior
417 proporção de positivos no período seco, comprovando que mesmo em períodos de estiagem a
418 leptospirose é recorrente, sendo capaz de sobreviver em ambientes hostis. A diferença
419 estatística entre os períodos com relação à positividade no fluido vaginal, com o período seco
420 apresentando 46,2% de positividade e o período chuvoso com 11,5% demonstra que a
421 transmissão venérea pode ser uma das rotas alternativas que representa adaptabilidade das
422 leptospiras em período de estiagem. Foi sugerida que a presença deste agente no ambiente
423 vaginal pode estar ligada à formação de biofilme propiciando sua colonização por tempo
424 desconhecido (Dhaliwal et al., 1996; Ristow et al., 2008; Loureiro et al., 2017). Outro aspecto
425 que merece destaque é que alguns fatores de ordem ambiental, como época do ano, escassez
426 de alimentos e mudanças bruscas de temperatura, que são comuns no período seco,
427 prejudicam a nutrição e imunidade dos animais e, conseqüentemente, a saúde geral do
428 rebanho, aumentando a suscetibilidade dos animais à doenças (Oliveira e Albuquerque, 2008)
429 e conseqüentemente agravando os problemas reprodutivos.

430 A maior frequência de materiais positivos na PCR no trato reprodutivo em
431 comparação ao urinário, apesar de não ter havido diferença estatística, bem como a alta
432 proporção de fluido vaginal PCR-positivo no período seco destaca o sítio reprodutivo como
433 um local extra renal de infecção em ovinos (Arent et al., 2013; Silva et al., 2018; Silva et al.,
434 2019) e fator contribuinte para o endemismo da doença nos rebanhos, e reforça uma linha de

435 pesquisa recente que considera a leptospirose genital uma síndrome específica sem ligação
436 com a doença renal e/ou sistêmica (Loureiro e Lilenbaum, 2020), ou seja, a colonização no
437 trato reprodutivo não é uma consequência unicamente da bacteremia, mas sim do tropismo
438 que as leptospiros têm também por este sítio. A alta frequência de detecção de DNA de
439 leptospiros em órgãos de ovinos abatidos no abatedouro público também revela um sério
440 problema de saúde pública, em que estes animais são fontes de infecção para médicos
441 veterinários, pecuaristas, manipuladores de produtos de origem animal entre outros
442 profissionais, tornando-os expostos a doença, principalmente aqueles que não fazem uso de
443 todos os equipamentos de proteção individual (Azevedo et al., 2004; Clazer et al., 2015).

444 Mesmo os três componentes (urina, rim e bexiga) do trato urinário estando
445 anatomicamente relacionado, em 43 (41,3%) animais os resultados destes órgãos não foram
446 coincidentes entre si, ou seja, houve casos com presença de DNA na urina, porém não no rim
447 e/ou bexiga. No trato reprodutivo, dos seus cinco sítios (suabe vaginal, útero, ovário, tuba
448 uterina e placenta), 60 (57,7%) também foram discordantes. Ainda foram relacionados os
449 resultados do suabe vaginal e urina, em que houve discordante presença de DNA nestes dois
450 fluidos em 22 (21,1%) animais. Mesmo com todos os cuidados necessários em coletar fluido
451 na região proximal ao fórnix e evitar contato com a urina, não se pode descartar totalmente a
452 ocorrência de contaminação, porém os resultados divergentes mostram que a infecção da
453 mucosa vaginal independe da presença de leptospiros na urina, assim como também relatado
454 anteriormente (Hamond et al., 2015). Este tipo de achado foi relatado em um estudo a partir
455 da análise molecular de nove amostras de fluido vaginal, seis de urina e uma de sêmen,
456 apenas uma ovelha teve resultado concordante entre fluido e urina (Director et al., 2014a),
457 demonstrando mais uma vez que leptospirose genital e urinária estão dissociadas (Loureiro e
458 Lilenbaum, 2020). Vale ressaltar que a eliminação de leptospiros na urina é intermitente,
459 portanto, mesmo em casos de resultados negativos em PCR ou cultura não se pode excluir a
460 possibilidade de o animal ser um portador. Neste caso, testes pareados podem ser necessários
461 para a detecção adequada de todos os portadores em um rebanho (Mitchell et al., 1999).
462 Também é importante ressaltar que a frequência de material com presença de DNA de
463 leptospiros poderia ser ainda maior, uma vez que resultados negativos podem estar ligados às
464 concentrações abaixo do limiar de detecção da PCR (Latosinski et al., 2018). Esta explicação
465 também pode estar relacionada ao fato de órgãos anatomicamente relacionados não terem
466 resultados moleculares semelhantes.

467 Os achados desta pesquisa reforçam a hipótese de que, embora muito útil para
468 diagnóstico de rebanho, a sorologia pode ser uma ferramenta insuficiente para identificar
469 portadores de forma individual, fazendo-se assim necessária a detecção direta da presença do
470 organismo para identificar e tratar com segurança os portadores (Faine et al., 1999). Em um
471 determinado estudo foi realizado diagnóstico molecular em um rebanho tido como negativo e
472 outro como positivo a partir da sorologia, e ao detectarem DNA de leptospiros nos dois
473 rebanhos, demonstraram que a PCR é fundamental para o reconhecimento de ovinos
474 portadores assintomáticos como parte dos programas de controle da leptospirose em ambiente
475 tropical (Director et al., 2014a). No entanto, a PCR demonstrou ser uma ótima alternativa
476 diagnóstica por ser rápida e ter alta sensibilidade e especificidade. Assim, é sempre
477 importante analisar métodos de diagnósticos pareados e em série.

478 A maior proporção de animais positivos na PCR em comparação a SAM, como
479 descrito anteriormente, deve-se ao fato de que as leptospiros são antígenos com baixa
480 antigenicidade e, portanto, induzem respostas imunes insatisfatórias e por um curto período de
481 tempo (Bolin et al., 1991; Venkataraman et al., 1994) e, além disso a infecção no animal pode
482 estar na fase crônica (Ellis, 2015). Assim, um animal soronegativo nem sempre está livre da
483 infecção. O uso do ponto de corte 50 na sorologia foi eficaz na detecção de ovinos fontes de
484 infecção, pois independentemente do material utilizado na PCR, as maiores sensibilidades
485 foram obtidas considerando esse ponto de corte, ou seja, foram obtidos menos resultados
486 falso-negativos. Isso é muito importante do ponto de vista epidemiológico e de controle de
487 infecções, pois impede a permanência de animais infectados no rebanho, uma vez que
488 infecções subclínicas são muito comuns.

489 O isolamento de leptospiros de culturas de amostras biológicas é o padrão ouro para o
490 diagnóstico (Picardeau, 2013). Apesar de todos os esforços para evitar a contaminação,
491 adicionando antibióticos apropriados ao meio de cultura e cultivando em um ambiente
492 higienicamente adequado, foi observado um alto nível de contaminação em algumas culturas,
493 o que é um achado comum, especialmente quando se trata de campo (Zuerner, 2005).
494 Entretanto, os três isolados obtidos do líquido vaginal reforçam a importância da via venérea
495 na transmissão da doença, como demonstrado na PCR, além de provar que as leptospiros
496 permanecem viáveis na mucosa vaginal (Director et al., 2014b).

497 **5. CONCLUSÃO**

498 Os resultados obtidos indicam que, mesmo diante de condições ambientais adversas na
499 região semiárida, as leptospiros sobrevivem e se propagam por vias alternativas de
500 transmissão, gerando animais portadores assintomáticos. A PCR demonstrou um grande
501 número de animais com leptospiros no trato genital, enfatizando o papel da fêmea na
502 transmissão venérea. Além disso, os resultados sorológicos mostraram o importante papel dos
503 roedores como fontes de infecção para ovinos, independentemente da estação (seca e
504 chuvosa). Em sorologia, o título 50 foi mais eficaz na detecção de portadores na PCR em
505 condições semiáridas em comparação com o título 100, normalmente usado em sorologia para
506 leptospirose.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por apoiar este projeto através dos protocolos 302222/2016-2 e 423836/2018-8.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

Conceptualização: DBN, SSA; Curadoria de dados: DBN, MLCRS, JPAJ, CDM, LSU, SSA; Análise formal: DBN, MLCRS, SSA; Aquisição de fundos: SSA, CJA; Investigação: DBN, FTRC, CSB, MLCRS, DFC, MPV, JDS, JPAJ, CDM, LSU, CJA, SSA; Metodologia: DBN, FTRC, CSB, MLCRS, DFC, MPV, JDS, JPAJ, CDM, LSU, CJA, SSA; Administração do projeto: SSA; Supervisão: SSA, CJA; Redação-rascunho original: DBN, SSA; Redação-revisão e edição: DBN, SSA, DFC.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

- Adler, B., De La Peña Moctezuma, A., 2010. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol.* 140, 287–296. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.012>
- Almeida, D.S., Paz, L.N., de Oliveira, D.S., Silva, D.N., Ristow, P., Hamond, C., Costa, F., Portela, R.W., Estrela-Lima, A., Pinna, M.H., 2019. Investigation of chronic infection by *Leptospira* spp. in asymptomatic sheep slaughtered in slaughterhouse. *PLoS.* 14, e0217391. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217391>
- Alves, C.J., Alcino, J.F., Farias, A.E.M., Higino, S.S.S., Santos, F.A., Azevedo, S.S., Costa, D.F., Santos, C.S.A.B., 2012. Caracterização epidemiológica e fatores de risco associados à leptospirose em ovinos deslançados do semiárido brasileiro. *Pesq. Vet. Bras.* 32, 523–528. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2012000600009>
- Alves, C.J., Clementino, I.J., Oliveira, A.G.F., Freitas, T.D., Vasconcellos, S.A., Morais, Z.M., 2004. Avaliação dos níveis de aglutininas anti-*Leptospira* em cães de caça na Paraíba, Brasil. *Ver. Bras. Ciênc. Vet.* 11, 68–73. <https://doi.org/10.4322/rbcv.2014.347>
- Alves, C.J., Vasconcellos, S.A., Camargo, C.R.A., Morais, Z.M., 1996. Influência dos fatores ambientais sobre a proporção de caprinos soro-reatores para a leptospirose em cinco centros de criação do Estado da Paraíba, Brasil. *Arq. Inst. Biol., São Paulo.* 63, 11–19.
- Araújo, S.M.S. A Região Semiárida do Nordeste do Brasil: Questões ambientais e possibilidades de uso sustentável dos recursos. *Rios Eletrônica- Revista Científica da FASETE.* https://www.unirios.edu.br/revistarios/media/revistas/2011/5/a_regiao_semiarida_do_nordese_do_brasil.pdf
- Arent, Z., Frizzell, C., Gilmore, C., Mackie, D., Ellis, W.A., 2013. Isolamento de leptospiros do trato genital de ovelhas. *Vet. Rec.* 173, 582. <https://doi.org/10.1136/vr.101969>
- Ayres, M., Ayres Junior, M., Ayres, D.L., Santos, A.S., 2007. Bioestat 5.0 Aplicações estatísticas nas das ciências biomédicas. ONG Mamiraua: Belém; PA, 364.
- Azevedo, S.S., Alves, C.J., de Andrade, J.S.L., dos Santos, F.A., Freitas, T.D., Batista, C.S.A., 2004. Isolation of *Leptospira* spp. from kidneys of sheep at slaughter. *Arq. Inst. Biol., São Paulo.* 71, 383–385.
- Batista, J.S., Riet-Correa, F., Teixeira, M.M.G., Madruga, C.R., Simões, S.D.V., Maia, T.F., 2007. Trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian semi-arid: description of an outbreak and lesions in the nervous system. *Vet Parasitol.* 143, 174–181. <https://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.08.017>
- Bharti, A.R., Nally, J.E., Ricaldi, J.N., Matthias, M.A., Diaz, M.M., Lovett, M.A., Levett, P.N., Gilman, R.H., Willig, M.R., Gotuzzo, E., Vinetz, J.M., 2003. *Leptospirosis*: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis, Amsterdã.* 3, 757–771. [https://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099\(03\)00830-2](https://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099(03)00830-2)
- Bolin, C.A., Phil, J.A.C., Zuerner, R.L., Trueba, G., 1991. Effect of vaccination with a monovalent *Leptospira interrogans* serovar Hardjo type Hardjo-bovis vaccine on type Hardjo-bovis infection of cattle. *Am. J. Vet. Res.* 52, 1639–1643.

Brasil. 2014. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância em Saúde. 1. ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde.

Campos, A.P., Miranda, D.F.H., Rodrigues, H.W.S., Lustosa, M.S.C., Martins, G.H.C., Mineiro, A.L.B, Castro, V., Azevedo, S.S., de Sousa Silva, S.M.M., 2017. Seroprevalence and risk factors for leptospirosis in cattle, sheep, and goats at consorted rearing from the State of Piauí, Northeastern Brazil. *Trop. Anim. Health Prod.*, Edinburgh. 49, 899–907. <https://dx.doi.org/10.1007/s11250-017-1255-2>

Castro, V., Azevedo, S.S., Gotti, T.B., Batista, C.S.A., Gentili, J., Moraes, Z.M., 2008. Soroprevalência da leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no Estado de São Paulo, Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo. 75, 3–11. http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/arq/v75_1/castro.pdf

Chakraborty, A., [Miyahara, S.](#), [Villanueva, S.Y.](#), [Saito, M.](#), [Gloriani, N.G.](#), [Yoshida, S.](#), 2001. Novel combination of selective agents for isolation of *Leptospira* species. *Microbiol. and Immunol.* 55, 494–501, 2011. <https://dx.doi.org/10.1111/j.1348-0421.2011.00347.x>

Ciceroni, L., Lombardo, D., Pinto, A., Ciarrocchi, S., Simeoni, J., 2000. Prevalence of antibodies to *Leptospira* serovars in sheep and goats in Alto Adige- South Tyrol. *J. Vet. Med.* 47, 217–223. <https://dx.doi.org/10.1046/j.1439-0450.2000.00333.x>

Clazer, M., Rodrigues, G.V., Araújo, L., Lopes, K.F.C., Zaniolo, M.M., Gerbasi, A.R.V., Gonçalves, D.D., 2015. Leptospirose e seu aspecto ocupacional - revisão de literatura. *Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR, Umuarama.* 18, 191-198.

Costa, D.F., Silva, A.F., Brasil, A.W.L., Loureiro, A.P.P., Santos, F.A., Azevedo, S.S., Lilenbaum, W., Ales, C.J., 2017. Leptospirosis in native mexed-breed sheep slaughtered a semiarid region of Brazil. *Cienc. Rural.* 47, e20160563. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20160563>

Costa, D.F., Silva, A.F., Farias, A.E.M., Brasil, A.W.L., Santos, F.A., Guilherme, R.F., Azevedo, S.S., Alves, C.J., 2016. Serological study of the *Leptospira* spp. infection in sheep and goats slaughtered in the State of Paraíba, semiarid of Northeastern Brazil, *Semina: Ciênc. Agrár.* 37, 819–828. <https://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n2p819>

Costa, D.F., Silva, M.L.C.R., Martins, G., Dantas, A.F.M., Melo, M.A., Azevedo, S.S., Lilenbaum, W., Ales, C.J., 2018. Susceptibility among breeds of sheep experimentally infected with *Leptospira interrogans* Pomona serogroup. *Microb Pathog.* 122, 79–83. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.06.017>

Costa, F., Hagan, J.E., Calcagno, J., Kane, M., Torgerson, P., Martinez-Silveira, M.S., Stein, C., Abela-Ridder, B., Ko, A.I., 2015. Global morbidity and mortality of leptospirosis: a systematic review. *PLOS Negl Trop Dis.* 17, 1–19. <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003898>

Cubas, Z.S., Silva, J.C.R., Catão-Dias, J.L., 2007. *Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária.* São Paulo: Roca. 1376

De Oliveira, D., Figueira, C.P., Zhan, L., Pertile, A.C., Pedra, G.G., Gusmão, I.M., Wunder, E. A., Rodrigues, G., Ramos, E. A. G., Ko, A. I., Childs, J. E., Reis, M. G., Costa, F., 2016. *Leptospira* in breast tissue and milk of urban Norway rats (*Rattus norvegicus*). *Epidemiol Infect.* 144, 2420–2429. <https://doi.org/10.1017/S0950268816000637>

Dhaliwal, G.S., Murray, R.D., Dobson, H., Montgomery, J., Ellis, W.A., 1996. Presence of antigen and antibodies in serum and genital discharges of cows from dairy herds naturally infected with *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. Res. Vet. Sci. 60, 163–167. [https://doi.org/10.1016/s0034-5288\(96\)90012-0](https://doi.org/10.1016/s0034-5288(96)90012-0)

Director, A., Martins, G., Loureiro, A.P., Reis, C., Medeiros, M., Lilenbaum, W., 2014a. Molecular detection of leptospiral carriers in sheep under tropical field conditions. Braz. J. Vet. Res. An. Sci. 51, 220–223. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.v51i3p220-223>

[Director, A., Penna, B., Hamond, C., Loureiro, A.P., Martins, G., Medeiros, M.A., Lilenbaum, W., 2014b.](#) Isolation of *Leptospira interrogans* Hardjoprajitno from vaginal fluid of a clinically healthy ewe suggests potential for venereal transmission. J. Med. Microbiol. 63, 1234–1236. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.065466-0>

Dohoo, I., Martin, W., Stryhn, H., 2003. Veterinary Epidemiologic Research. Charlottetown: Atlantic Veterinary College. 705.

Ellis, W.A., Songer, J.G., Montgomery, J., Cassels, J.A., 1986. Prevalence of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo in the genital and urinary tracts of non-pregnant cattle. Vet. Rec. 118, 11–3.

Ellis, W.A., 2015. Animal leptospirosis. Curr Top Microbiol Immunol. 387, 99–137

Escócio, C., Genovez, M.E., Castro, V., Piatti, R.M., Gabriel, F.H.L., Chiebao, D.P., Azevedo, S.S., Veira, S.R., Chiba, M., 2010. Influência das condições ambientais na transmissão da leptospirose entre criações de ovinos e bovinos da região de Sorocaba, SP, Arq. Inst. Biol., São Paulo. 77, 371–379. http://www.biologico.agricultura.sp.gov.br/uploads/docs/arg/v77_3/escocio.pdf

Faine, S., Adler, B., Bolin, C., Perolat, P., 1999. *Leptospira* and leptospirosis. 2nd ed. Med. Sci., Melbourne. 272

Favero, A.C.M., Pinheiro, S.R., Vasconcellos, S.A., Morais, Z.M., Ferreira, F., Ferreira Neto, J.S., 2002. Sorovares de leptospiras predominantes em exames sorológicos de bubalinos, ovinos, caprinos, equinos, suínos e cães de diversos estados brasileiros. Ciênc. Rural. 32, 613–619. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782002000400011>

Gamage, C.D., Koizumi, N., Muto, M., Nwafor-Okoli, C., Kurukurusuriya, S., Rajapakse, J.R.P.V., Kularatne, S.A.M., Kanda, K., Lee R.B., Obayashi, Y., Watanabe, H., Tamashiro, H., 2011. Prevalence and carrier status of leptospirosis in smallholder dairy cattle and peridomestic rodents in Kandy, Sri Lanka. Vector-Borne Zoonotic Dis. 11, 1041–1047. <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2010.0153>

Giangaspero, M., Bonfini, B., Orusa, R., Savini, G., Osawa, T., Harasawa, R., 2013. 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. J. Vet. Med. Sci. 75, 679–684. <http://dx.doi.org/10.1292/jvms.12-0384>

Gobel, T., 2001. Furões, tratamento das doenças infecciosas. Nosso Clínico Medicina Veterinária para Animais de Companhia. 4, 18–24.

[Gouy, M., Guindon, S., Gascuel, O., 2010.](#) SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. Mol. Biol. and Evol. 27, 221–224. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msp259>

Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41, 95–98. <http://brownlab.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1.pdf>

Hamond, C., Pestana, C.P., Rocha-de-Souza, C.M., Cunha, L.E., Brandão, F.Z., Medeiros, M.A., Lilenbaum, W., 2015. Presence of leptospires on genital tract of mares with reproductive problems. *Vet. Microbiol.* 179, 264–269. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.06.014>

Hamond, C.; Martins, G.; Loureiro, A. P.; Pestana, C.; Lawson-Ferreira, R.; Medeiros, M. A., Lilenbaum, W., 2014. Urinary PCR as an increasingly useful tool for na accurate diagnosis of leptospirosis in livestock, *Vet. Res. Commun.* 38, 81–85. <https://doi.org/10.1007/s11259-013-9582-x>

Herrmann, G.P., Lage, A.P., Moreira, E.C., Haddad, J.P.A., Resende, J.R., Rodrigues, R.O., Leite, R.C., 2004. Soroprevalência de aglutininas anti-*Leptospira* spp. em ovinos nas Messoregiões Sudeste e Sudoeste do Estado Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciê. Rural.* 34, 443–448. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782004000200017>

Higino, S.S.S., Azevedo, S.S., Alves, C.J., Figueiredo, S.M., Silva, M.L.C.R., Batista, C.S.A., 2010. Frequência de leptospirose em ovinos abatidos no município de Patos, Paraíba. *Arq. Inst. Biol., São Paulo.* 77, 525–527

Higino, S.S.S., Azevedo, S.S., 2014. Leptospirose em pequenos ruminantes: situação epidemiológica atual no Brasil. *Arq. Inst. Biol., São Paulo.* 81, 86–94. <http://www.scielo.br/pdf/aib/v81n1/1808-1657-aib-81-01-00086.pdf>

Higino, S.S.S., SANTOS, F.A., Costa, D.F., Santos, C.S.A.B., Silva, M.L.C.R., Alves, C.J, Azevedo, S.S., 2013. Flock-level risk factors associated with leptospirosis in dairy goats in a semiarid region of Northeastern Brazil. *Prev. Vet. Med.* 109, 158–161. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.09.005>

INMET [internet]. Instituto Nacional de Meteorologia. Estação Meteorológica de Observação de Superfície Automática. [cited 2019 out 15]. Available from: <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=estacoes/estacoesAutomaticas>

Latosinski, G.S., Fornazari, F., Babboni, S.D., Caffaro, K.P., Antonio, C., Langoni, H., 2018. Serological and molecular detection of *Leptospira* spp in dogs. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 51, 364–367. <https://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0276-2017>

Lenharo, D.K., Santiago, M.E.B., Lucheis, S.B., 2012. Avaliação sorológica para leptospirose em mamíferos silvestres procedentes do parque zoológico municipal de Bauru, SP. *Arq. Inst. Biol., São Paulo.* 79, 333–341 <http://www.scielo.br/pdf/aib/v79n3/a03v79n3.pdf>

Lilenbaum, W., Varges, R., Brandão, F.Z., Cortez, A., Souza, S.O., Brandão, P.E., Richtzenhain, L.J., Vasconcellos, S.A., 2008. Detection of *Leptospira* spp. in semen and vaginal fluids of goats and sheep by polymerase chain reaction. *Theriogenology.* 69, 837–842. <https://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.10.027>.

Lilenbaum, W., Varges, R., Ristow, P., Cortez, A., Souza, S.O., Richtzenhain, L.J., Vasconcellos S.A., 2009. Identification of *Leptospira* spp. carriers among seroreactive goats and sheep by polymerase chain reaction. *Res. Vet. Sci.* 87, 16–19. <https://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2008.12.014>

Loureiro, A.P., Lilenbaum, W., 2020. Genital bovine leptospirosis: A new look for an old disease. *Theriogenology.* 141, 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.011>

- Loureiro, A.P., Pestana, C., Medeiros, M.A., Lilenbaum, W., 2017. High frequency of leptospiral vaginal carriers among slaughtered cows. *Anim. Reprod. Sci.* 178, 50-54. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.01.008>
- Mackinnon, A., 2000. A spreadsheet for the calculation of comprehensive statistics for the assessment of diagnostic tests and inter-rater agreement. *Comput. Biol. Med., Philadelphia.* 30, 127–134. [https://dx.doi.org/10.1016/s0010-4825\(00\)00006-8](https://dx.doi.org/10.1016/s0010-4825(00)00006-8)
- Magajevski, F.S., Girio, R.J.S., Mathias, L.A., Myashiro, S., Genovez, M.E., Scarcelli, E.P., 2005. Detection of *Leptospira* spp. in the semen and urine of bulls serologically reactive to *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *Braz. J. Microbiol.* 36, 43–47. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822005000100009>
- Martins, G., Lilenbaum, W., 2015. Comments of Environmental Conditions for the Maintenance of *Leptospira* in Tropical Scenarios. *Curr. Microbiol.* 71, 624-625. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0894-7>
- Martins, G., Penna, B., Hamond, C., Leite, R.C.K., Silva, A., Ferreira, A., Brandão, F., Oliveira, F., Lilenbaum, W., 2012a. Leptospirosis as the most frequent infectious disease impairing productivity in small ruminants in Rio de Janeiro, Brazil. *Trop. Anim. Health. Prod.* 44, 773–777. <https://doi.org/10.1007/s11250-011-9964-4>
- Martins, G., Brandão, F.Z., Hamond, C., Medeiros, M., Lilenbaum, W., 2012b. Diagnosis and control of an outbreak of leptospirosis in goats with reproductive failure. *Vet. J.* 193, 600–601. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.01.016>
- Matias, R.S., Oliveira, W., Stedile, V.M., 2002. *Biologia, Comportamento e Medidas De controle de roedores.* Instituto Bio Geneziz, Campinas. 623–671.
- Mitchell, M.A., Hungerford, L.L., Nixon, C., Eske, T., Sullivan, J., Koerkenmeier, R., Dubey, J.P., 1999. Serologic survey for selected infectious disease agents in raccoons from Illinois. *J. Wildl. Dis., Kansas.* 35, 347–355.
- Natarajaseenivasan, K., Ratnam, S., 1999. Isolation of *Leptospira javanica* from sheep. *Indian J Anim Sci.* 69, 759–820. <http://epubs.icar.org.in/ejournal/index.php/IJAnS/article/view/21277>>
- OIE., 2014. Reference laboratory reports activities. Ulster, Northern Ireland, World Organization for Animal Health.
- Oliveira, E.L., Albuquerque, F.H.M.A.R., 2008. Manejo Sanitário de Pequenos Ruminantes. Sobral: Ceará: EMBRAPA- Caprinos e Ovinos, mDocumentos 77. <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/534126/1/doc77.pdf>
- Otaka, D.Y., Martins, G., Hamond, C., Penna, B., Medeiros, M.A., Lilenbaum, W., 2012. Serology and PCR for bovine leptospirosis: herd and individual approaches. *Vet. Rec.* 170, 338. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.100490>
- Picardeau, M., 2013. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Médecine et maladies infectieuses.* 43:1-9
- Pimenta, C.L.R.M., Bezerra, C.S., Morais, D.A., Silva, M.L.C.R., Nogueira, D.B., Costa, D.F., Santos, C.S.A.B., Higino, S.S.S, Alves, C.J., Azevedo, S.S., 2019. Seroprevalence and predominant serogroups of *Leptospira* sp. in serological tests of ruminants in northeastern Brazil. *Semina: Ciênc. Agrár., Londrina.* 40, 1513–1522. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2019v40n4p1513>

Pinna, M.H., Martins, G., Loureiro, A.P., Lilenbaum, W., 2018. Detection of bovine carriers of *Leptospira* by serological, bacteriological, and molecular tools. *Trop. Anim. Health. Prod.* 50, 883–888. <https://doi.org/10.1007/s11250-018-1512-z>

Platt, A.R., Woodhall, R.W., George, A.L.Jr., 2007. Improved DNA sequencing quality and efficiency using an optimized fast cycle sequencing protocol. *BioTechniques.* 43, 58–62. <http://dx.doi.org/10.2144/000112499>

Ristow, P., Bourhy, P., Kerneis, S., Schmitt, C., Prevost, M.C., Lilenbaum, W., Picardeau, M., 2008. Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospire. *Microbiology.* 154, 1309–1317. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/014746-0>

Romero-Vivas, C.M., Thiry, D., Rodríguez, V., Calderón, A., Arrieta, G., Máttar, S., Cuello, M., Levett, P.N., Falconar, A.K., 2013. Molecular serovar characterization of *Leptospira* isolates from animals and water in Colombia. *Biomédica, Bogotá.* 33, 179–184. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24652261>

Santa Rosa, C.A., Sulzer, C.R., Giorgi, W., Silva, A.S., Yanaguaita, M., Lobao, A.O., 1975. *Leptospirosis* in wildlife in Brazil: isolation of a new serotype in the Pyrogenes group. *Am. J. Vet. Res.* 361, 363–1365.

Santos, T.C.P., Peña-Alfaro, C.E., Figueiredo, S.M., 2011. Aspectos sanitários e de manejo em criações de caprinos e ovinos na microrregião de Patos, região semi-árida da Paraíba. *Ciênc. Anim. Bras., Goiânia.* 12, 206-212. 1 0.521 6/cab.v1 2i.4420

Silva, A.F., Farias, P.J.A., Silva, M.L.C.R., Araújo Júnior, J.P., Malossi, C.D., Ullmann, L.S., Costa, D.F., Higino, S.S.S., Azevedo, S.S., Alves, C.J., 2018. High frequency of genital carriers of *Leptospira* sp. in sheep slaughtered in the semi-arid region of northeastern Brazil. *Trop. Anim. Health Prod.* 51, 43. <https://doi.org/10.1007/s11250-018-1657-9>

Silva, A.S., Souza, C.F., Baldissera, M.D., Von Laer, A.E., Lovato, L.T., Sarturi, J.A., Hermann, G.P., Moura, A.B., Favaretto, J.A., Frias-De-Diego, A., Machado, G., 2019. Relation of reproductive disturbance in sheep and *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae infection: Impacts on cellular oxidation status, *Microb. Pathog.* 130, 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.02.029>

Silva, E.F., Brod, C.S., Cerqueira, G.M., Bourscheidt, D., Seyffert, N., Silva, A.Q., Santos, C.S., Ko, A.I., Dellagostin, O. A., 2007. Isolation of *Leptospira noguchii* from sheep. *Vet. Microbiol.* 121, 144–149. <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/12143>

Silva, E.F., Félix, S.R., Cerqueira, G.M., Fagundes, M.Q., Neto, A.C.P.S., Grassmann, A.A., Amaral, M.G., Gallina, T., Dellagonstin, O.A., 2010. Short Report: Preliminary Characterization of *Mus musculus*–Derived Pathogenic Strains of *Leptospira borgpetersenii* Serogroup Ballum in a Hamster Model. *Am. J. Trop. Med. Hyg., Deerfield.* 83, 336–337. <http://dx.doi.org/10.4269 / ajtmh.2010.10-0120>

Stoddard, R.A., Gee, J.E., Wilkins, P.P., Mccaustland, K., Hoffmaster, A.R., 2009. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 64, 247–255. <https://doi.org/10.1016 / j.diagmicrobio.2009.03.014>

Suepaul, S.M., Carrington, C.V., Campbell, M., Borde, G., Adesiyun, A.A., 2011. Seroepidemiology of leptospirosis in livestock in Trinidad. *Trop. Anim. Health Prod.* 43, 367–375. <https://doi.org/10.1007 / s11250-010-9698-8>

Venkataraman, K.S., Nedunchelliyan, S., Ramadass, P., Ramkrishna, J., 1994. Immune response in dogs with experimental leptospirosis. *Indian J. Comp. Microbiol. Immunol. Infect. Dis.* 15, 21–25.

Vermunt, J.J., West, D.M., Cooke, M.M., Alley, M.R., Collins-Emerson, J., 1994. Observations on three outbreaks of *Leptospira interrogans* serovar Pomona infection in lambs, N. Z. *Vet. J.* 42, 133–139.

Vijayachari, P., Sugunan, A.P., Shriram, A.N., 2008. Leptospirosis: an emerging global public health problem. *Journal of Bioscience.* 33, 557–569. <https://doi.org/10.1007/s12038-008-0074-z>

Zuerner, R.L., 2005. Laboratory maintenance of pathogenic *Leptospira*. *Curr Protoc Microbiol.* 12, 1–13. <https://doi.org/10.1002 / 9780471729259.mc12e01s00>

Tabela 1. Sorogrupos mais frequentes e seus respectivos títulos de anticorpos em ovinos abatidos nos períodos seco e chuvoso no Nordeste do Brasil, 2018 e 2019.

Sorogrupos infecciosos	Período seco							Período chuvoso							Total (%)
	50	100	200	400	800	1600	Total	50	100	200	400	800	1600	Total	
Icterohaemorrhagiae	1	-	1	1	1	1	5 (41,7%)	-	-	-	-	-	-	-	05 (19,2%)
Pomona	1	-	2	-	-	-	3 (25%)	-	-	-	-	-	-	-	03 (11,5%)
Autumnalis	1	-	-	-	-	-	1 (8,3%)	-	-	-	-	-	-	-	1 (3,8%)
Javanica	1	-	-	-	-	-	1 (8,3%)	-	-	-	-	-	-	-	1 (3,8%)
Australis	1	-	-	-	-	-	1 (8,3%)	-	-	-	-	-	-	-	1 (3,8%)
Tarasovi	-	-	1	-	-	-	1 (8,3%)	-	-	-	-	-	-	-	1 (3,8%)
Pyrogenes	-	-	-	-	-	-	-	6	3	-	-	-	-	9 (64,3%)	09 (34,6%)
Ballum	-	-	-	-	-	-	-	3	1	-	-	-	-	4 (28,6%)	04 (15,4%)
Grippytyphosa	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1 (7,1%)	1 (3,8%)
Total	5 (41,7%)	-	4 (33,3%)	1 (8,3%)	1 (8,3%)	1 (8,3%)	12 (100%)	9 (64,3%)	5 (35,7%)	-	-	-	-	14 (100%)	26 (100%)

Tabela 2. Resultados da PCR em órgãos coletados nos períodos seco e chuvoso no Nordeste do Brasil, 2018 e 2019.

Material biológico	Período seco		Período chuvoso		<i>P</i>
	Número total de amostras	Número de amostras positivas (%)	Número total de amostras	Número de amostras positivas (%)	
Fluido vaginal	52	24 (46,2) ^a	52	06 (11,5) ^b	0.0002
Urina	52	14 (26,9) ^a	52	06 (11,5) ^a	0.0816
Útero	52	19 (36,5) ^a	52	21 (40,4) ^a	0.8430
Ovário	52	13 (25) ^a	52	17 (32,7) ^a	0.5161
Tuba uterina	52	22 (42,3) ^a	52	15 (28,8) ^a	0.2191
Rim	52	20 (38,5) ^a	52	12 (23,1) ^a	0.1370
Bexiga	52	15 (28,8) ^a	52	15 (28,8) ^a	1.0000
Placenta	10	08 (80) ^a	20	10 (50) ^a	0.1412

Tabela 3. Resultados da PCR nos tratos reprodutivo e urinário nos períodos seco e chuvoso no Nordeste do Brasil.

Trato	Período seco		Período chuvoso	
	Número total de amostras	Número de amostras positivas (%)	Número total de amostras	Número de amostras positivas (%)
Reprodutivo	218	86 (39,4) ^{A, a}	228	69 (30,3) ^{A, b}
Urinário	156	49 (31,4) ^{A, a}	156	33 (21,2) ^{A, b}
Total	374	135 (36,1) ^a	384	102 (26,6) ^b

Diferentes letras minúsculas e maiúsculas sobrepostas na mesma linha e coluna, respectivamente, indicam diferença estatística entre proporções ($P \leq 0.05$).

Tabela 4. Número de animais positivos e negativos na PCR por material biológico e considerando qualquer material em cada ponto de corte (50 e 100) da SAM nos períodos seco e chuvoso.

Período	SAM			PCR-urina		PCR-fluido vaginal		PCR-bexiga		PCR-rim		PCR-útero		PCR-ovário		PCR-tuba uterina		PCR-placenta		PCR-qualquer material	
	Título	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N
Seco	50	12	40	4	8	6	6	4	8	6	6	6	6	6	6	5	7	1	0	9	3
	100	7	45	2	5	4	3	2	5	4	3	4	3	4	3	2	5	0	0	6	1
Chuvoso	50	14	38	3	11	1	13	4	10	7	7	6	8	4	10	7	7	4	4	11	3
	100	5	47	2	3	1	4	2	3	2	3	4	1	2	3	3	2	3	1	5	0

P: positivo; N: negativo

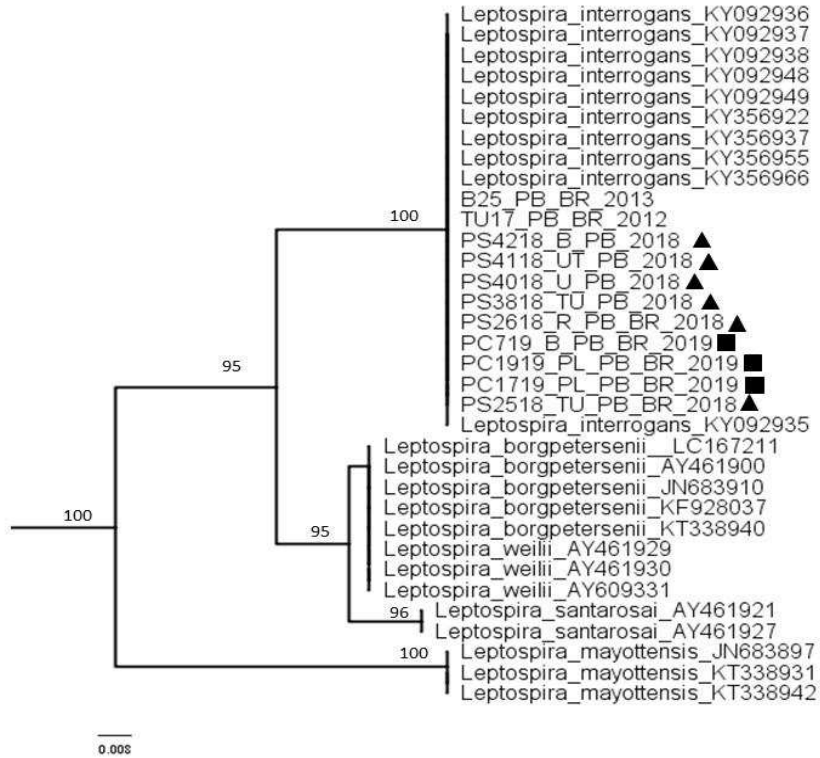
Tabela 5. Sensibilidade e especificidade (%) do SAM nos títulos 50 e 100 comparado ao PCR para material biológico e considerando qualquer material nos períodos seco e chuvoso.

Período	Título	Parâmetro	Urina	Fluido vaginal	Bexiga	Rim	Útero	Ovário	Tuba uterina	Placenta	Qualquer material
Seco	50	Sem	28.6	25	26.7	30	31.6	46.1	22.7	12.5	22.5
		Esp	78.9	78.6	78.3	81.2	81.8	84.6	76.7	100	75
	100	Sem	14.3	16.7	13.3	20	21.0	30.8	9.1	0	15
		Esp	86.8	89.3	86.5	90.6	90.9	92.3	83.3	100	91.7
Chuvoso	50	Sem	50	16.7	26.7	58.3	28.6	23.5	46.7	40	37.9
		Esp	76.1	71.7	73	82.5	74.2	71.4	81.1	60	87
	100	Sem	33.3	16.7	13.3	16.7	19.0	11.8	20	30	16.7
		Esp	93.4	91.3	91.9	92.5	96.8	91.4	94.6	90	100

Sen: sensibilidade; Esp: especificidade

Legenda da figura

Figura 01. Árvore filogenética construída pelo método de vizinhança e modelo Jukes-Cantor, autoinicialização com 1.000 repetições. ▲ ■ Amostras sequenciadas



CAPÍTULO II:

Transmissão vertical de *Leptospira* sp. em ovelhas abatidas em uma região de clima semiárido

Denise Batista Nogueira, Flávia Teresa Ribeiro da Costa, Rafael Rodrigues Soares, Igor Felipe Ferreira de Vasconcelos, Nathanael Natércio da Costa Barnabé, Brunna Muniz Rodrigues Falcão, Maria Luana Cristiny Rodrigues Silva, Diego Figueiredo da Costa, João Pessoa Araújo Júnior, Camila Dantas Malossi, Leila Sabrina Ullmann, Clebert José Alves, Sérgio Santos de Azevedo

Artigo a ser submetido à revista Microbial Pathogenesis (JCR 2.581, Qualis A3)

Transmissão vertical de *Leptospira* sp. em ovelhas abatidas em uma região de clima semiárido

Denise Batista Nogueira^a, Flávia Teresa Ribeiro da Costa^a, Rafael Rodrigues Soares^a, Igor Felipe Ferreira de Vasconcelos^a, Nathanael Natércio da Costa Barnabé^a, Brunna Muniz Rodrigues Falcão^a, Maria Luana Cristiny Rodrigues Silva^a, Diego Figueiredo da Costa^b, João Pessoa Araújo Júnior^c, Camila Dantas Malossi^c, Leila Sabrina Ullmann^c, Clebert José Alves^a, Sérgio Santos de Azevedo^{a,*}

^a Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR), Av. Universitária, s/n, Santa Cecília, Patos, PB 58708-110, Brasil;

^b Universidade Estadual Paulista (Unesp), Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro, s/n, campus de Botucatu, Botucatu, SP 18618-687, Brasil

507 **RESUMO**

508 A leptospirose é uma enfermidade responsável por problemas reprodutivos, que através da
 509 transmissão vertical é capaz de atingir fetos causando interrupção do processo gestacional,
 510 nascimento de crias fracas e natimortos. O objetivo do presente estudo foi detectar através de
 511 técnicas sorológica e molecular, a frequência de transmissão vertical de *Leptospira* sp. em
 512 fetos de ovinos abatidos no Semiárido nordestino e desta forma enfatizar este tipo de
 513 transmissão do agente como via alternativa, contribuindo para manutenção das taxas de
 514 infecção de leptospirose. Após abate das progenitoras, os conceptos foram retirados do
 515 ambiente uterino e conduzidos ao laboratório, onde foram necropsiados. Amostras de sangue
 516 das matrizes e dos fetos foram coletados para investigação da ocorrência de anticorpos anti-
 517 *Leptospira* sp. através da soroprecipitação microscópica (SAM). Para análise molecular
 518 através da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) a partir dos conceptos, foram coletadas
 519 amostras do sistema nervoso central (SNC), pulmão, fígado, baço, conteúdo estomacal,
 520 líquido peritoneal, rim, bexiga, urina e sistema reprodutor e naqueles que estavam no início da
 521 formação, as amostras consistiram apenas em sistema nervoso central e macerado do tórax
 522 (ovóide córmico). Foram amostradas 23 progenitoras e destas, sete apresentaram anticorpos a
 523 partir do título 50. Em relação aos fetos, foram coletados um total de 29, sendo dois (6,9%)
 524 soropositivos na titulação 10 para os sorogrupos Pyrogenes, Tarassovi e Autumnalis. Na PCR,
 525 24 (82,7%) tiveram pelo menos um órgão positivo. De um total de 209 amostras, em 61
 526 (29,2%) foi comprovada a presença de DNA leptospírico. O sequenciamento de DNA
 527 leptospirico foi possível em três amostras de fragmentos de rim, SNC e fígado com 99,27%
 528 similares a *L. interrogans*. Na análise macroscópica foram observados que três fetos possuíam
 529 múltiplas malformações. Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que a
 530 transmissão vertical é uma importante via alternativa de disseminação do agente. Além disso,
 531 pode-se perceber que a PCR é uma ferramenta essencial na investigação de leptospirose em
 532 fetos.

533 **1. Introdução**

534 A produção de ovinos é uma atividade de grande importância para a subsistência, sustento
 535 econômico e social de várias famílias residentes em áreas rurais no Brasil [1]. No entanto, há
 536 alguns fatores que geram quadro produtivo insatisfatório. Persistentes falhas reprodutivas
 537 estão associadas a causas multifatoriais, podendo ter como etiologia infecções por agentes
 538 patogênicos, sendo a leptospirose uma enfermidade frequente [2,3]. A Leptospirose está a

539 abortamentos, natimortos, infertilidade e retenção placentária, diminuindo a produtividade em
540 animais de produção e, conseqüentemente, gerando perdas econômicas a nível nacional e
541 global [4,5]. Contudo, ainda é uma enfermidade negligenciada [6].

542 A transmissão de *Leptospira* sp. pode ocorrer de forma indireta através do contato com
543 água ou urina contaminada e restos placentários [4, 7, 8] ou de forma direta, a exemplo da via
544 venérea e da via transplacentária, visto que o agente foi detectado n no sêmen, no material
545 fetal e no fluido vaginal [9, 10], uma vez que as leptospiras são capazes de atingir e colonizar
546 o trato reprodutor de fêmeas [11,12]. Ao infectar o útero gravídico, estas espiroquetas causam
547 infecção placentária e alcançam o feto causando interrupção do processo gestacional [13],
548 sendo possível a detecção do agente em amostras de abortos [14, 15, 16, 17].

549 Apesar de muitos avanços em pesquisas, ainda não se entende completamente a patogenia
550 das leptospiras nos hospedeiros, visto os mecanismos de virulência que o agente apresenta
551 [18]. Da mesma forma, a patogênese da doença reprodutiva é pouco elucidada, porém se sabe
552 que a localização e persistência deste agente no útero leva a infecção fetal e problemas
553 reprodutivos [19]. A amplitude e o período da leptospiremia materna está envolvido na
554 infecção pela via transplacentária [20].

555 Em espécies de animais domésticos, bovino [21, 22] e equino [23, 24] e até mesmo em
556 humanos [25], foram relatados indícios de transmissão vertical da leptospirose com
557 ocorrência de aborto. No entanto, na espécie ovina, problemas reprodutivos são pouco
558 relatados na literatura [26]. Observou-se a transmissão vertical de leptospirose com detecção
559 direta do agente em leitões clinicamente saudáveis nascidos de matrizes infectadas
560 experimentalmente, demonstrando a manutenção das leptospiras por meio de animais com
561 infecção subclínica que albergam o agente e propagam o mesmo no ambiente [27].

562 A maior parte das pesquisas sobre leptospirose em fetos se referem àqueles naturalmente
563 abortados [24, 28, 29, 30]. Uma vez que a legislação brasileira permite o abate de fêmeas com
564 gestação recente ou intermediária com a devida condenação dos fetos [31], buscou-se analisar
565 esta patologia em fetos ovinos que estavam em pleno estágio de formação, assim como nas
566 suas progenitoras. Desta forma, com base na importância da Leptospirose na reprodução e na
567 escassa quantidade de informações sobre a transmissão transplacentária na espécie ovina, o
568 objetivo deste trabalho é relatar a presença de DNA de *Leptospira* sp. em diversos órgãos de
569 fetos em estágio gestacional de ovelhas abatidas no abatedouro público municipal na cidade
570 de Patos-PB e desta forma enfatizar a transmissão vertical do agente como via alternativa,
571 contribuindo para manutenção das taxas de infecção de leptospirose.

572 2. Material e Métodos

573 2.1. Desenho do estudo

574 Este estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de
575 Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande, sob protocolo nº100-
576 2018. As coletas foram realizadas no período de setembro a novembro de 2018 e de março a
577 maio de 2019, os quais corresponderam, respectivamente, aos períodos seco e chuvoso.

578 A presente pesquisa foi conduzida no Abatedouro Público Municipal de Patos-PB
579 (Latitude: 07° 01' 28" S; Longitude: 37° 16' 48" W), onde acontece abate de animais
580 provenientes deste município e circunvizinhos, sob inspeção Médica Veterinária. Os fetos
581 foram provenientes de 23 matrizes em estados recentes e intermediários de gestação, que
582 comprovadamente eram positivas para Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) de no mínimo
583 um órgão do trato reprodutivo (fluido vaginal, útero, ovário, tuba uterina e placenta) e/ou
584 urinário (urina, rim e bexiga).

585 2.2. Coleta das amostras

586 Após a retirada dos fetos do ambiente uterino, os mesmos foram acondicionados em sacos
587 plásticos estéreis dentro de isopor e levados ao Laboratório de Doenças Transmissíveis
588 (LDT)/Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

589 Em ambiente asséptico e com material estéril foi realizada punção cardíaca para obtenção
590 de sangue fetal. O sangue foi centrifugado à 3000rpm durante dez minutos e as amostras de
591 soro armazenadas em microtubos, sendo posteriormente congeladas a -20 °C até a realização
592 do teste de soroprecipitação microscópica (SAM). Após análise macroscópica para observação
593 de alguma lesão ou malformação externa, os fetos foram necropsiados e a depender do estágio
594 gestacional dos mesmos, foram coletadas amostras do sistema nervoso central, pulmão,
595 fígado, baço, conteúdo estomacal, líquido peritoneal, rim, bexiga, urina e sistema reprodutor.
596 Os órgãos foram coletados na quantidade de 1 grama e os fluidos foram obtidos por meio do
597 uso de seringas estéreis, todas em duplicata, acondicionadas em microtubos livres de DNA e
598 RNA e armazenadas a -20° C. Naqueles que estavam no início da formação, as amostras
599 consistiram apenas em sistema nervoso central e macerado do tórax (ovóide córmico).
600 Posteriormente todas estas amostras foram encaminhadas para análise molecular por meio da
601 PCR.

602 2.3. Teste de Soroaglutinação Microscópica (SAM)

603 A detecção de anticorpos anti-*Leptospira* sp. foi realizada por meio do teste de
604 aglutinação microscópica (SAM), usando uma coleção de 24 sorovares pertencentes a 17
605 diferentes sorogrupos patogênicos de cinco espécies: *L. interrogans*: sorovares Copenhageni,
606 Canicola, Autumnalis, Wolffi, Hardjoprajitno, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Kennewicki,
607 Hebdomadis, Pyrogenes, Bratislava e Australis; *L. santarosai*: sorovares Guaricura, Shermani
608 e Canalzoni; *L. borgpetersenii* sorovares Javanica, Tarassovi, Ballum, Mini e Castellonis; *L.*
609 *kirschneri* sorovares Grippotyphosa e Cynopteri; *L. noguchi* sorovares Panama e Lousiana
610 [32]. Para a sorologia fetal, a triagem foi realizada com título 10 [30] e para as matrizes foi
611 utilizado o título 50. As amostras positivas foram posteriormente tituladas de forma seriada
612 em razão de dois, sendo o título mais alto referido ao sorogrupo infectante.

613 2.4. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciamento

614 O DNA foi extraído dos tecidos, fluido vaginal e urina usando o Kit Dneasy Blood and
615 Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany), seguindo as recomendações do fabricante. A reação
616 em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada conforme descrito anteriormente [33]. Os
617 primers *LipL32-45F* (5'-AAG CAT TAC CGC TTG TGG TG-3') and *Lip L32-286R* (5'-GAA
618 CTC CCA TTT CAG CGA TT-3'), assim como proposto anteriormente por [34], foram
619 utilizados para amplificar o gene *LipL32*, específico para leptospiros patogênicas. O
620 sorogrupo *L. interrogans*, Pomona sorovar Kennewicki foi utilizado como controle positivo e
621 a água ultrapura como controle negativo.

622 As reações de sequenciamento foram realizadas usando os iniciadores *LipL32-45F* e
623 *LipL32-286R* [34] com o Kit de Sequenciamento Big Dye Terminator v3.1 (Applied
624 Biosystems, Foster City, CA, EUA). Para eletroforese capilar, foram utilizados um Analisador
625 Genético 3130xl e polímero POP-7 [35]. O alinhamento da sequência foi realizado usando o
626 BioEdit [36], enquanto as sequências do conjunto de dados foram obtidas no GenBank
627 (Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia, Bethesda, MD, EUA)
628 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), usando a ferramenta BLAST [http:](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)
629 [//www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). A análise filogenética foi realizada usando o pacote de
630 software Seaview4 [37], e a árvore filogenética foi construída usando o modelo de associação
631 de vizinhos, com um valor de bootstrap de 1000 repetições
632 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>, visualizado através do FigTree v1.4.3

633 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>). A reconstrução filogenética incluiu sequências de *Leptospiras* para
634 comparação.

635 3. Resultados

636 Foram amostrados 29 fetos em diferentes períodos gestacionais, dos quais 12 eram
637 machos, 13 fêmeas e em quatro não foi possível identificar o sexo. Ainda dentre esses houve
638 seis pares gemelares. Os primeiros 14 fetos foram coletados no período seco e os 15 demais
639 no período chuvoso.

640 Das 23 progenitoras testadas na SAM, sete apresentaram anticorpos com título variando
641 entre 50 e 100, para os sorogrupos Castellonis, Autumnalis e Pyrogenes. Em nenhum feto
642 foram detectados anticorpos de defesa no título 50. Porém, em menor diluição, 1:10, dois
643 fetos (6,9%) reagiram positivamente, sendo o primeiro concomitantemente para os sorogrupos
644 Pyrogenes e Tarassovi e o segundo para Autumnalis, ambos filhos de mães soronegativas. O
645 primeiro feto soropositivo apresentou DNA leptospírico por meio da PCR no fígado e sistema
646 nervoso central, enquanto que o segundo apresentou no fígado e no baço.

647 Dos 29 fetos, 24 (82,7%) tiveram pelo menos um órgão positivo no teste molecular. De um
648 total de 209 amostras, em 61 (29,2%) foi comprovada a presença de DNA leptospírico. A
649 ordem decrescente de material biológico com maior frequência de positivos foi: ovóide
650 córmico 02/04 (50%) sistema nervoso central 13/29 (44,8%), fígado 09/25 (36%), rim 9/25
651 (36%), aparelho reprodutor 08/25 (32%), baço 07/25 (28%), conteúdo estomacal 07/25 (28%),
652 fluido peritoneal 03/22 (13,6%) e pulmão 03/25 (12%). Dos 14 fetos coletados no período
653 chuvoso, todos foram positivos na PCR e dos 15 do período chuvoso, em 10 (66,7%) foi
654 detectado DNA. Nos dois períodos houve maior destaque para a alta frequência de positivos a
655 partir do SNC (Tabela 01).

656 O sequenciamento de DNA diretamente dos produtos da PCR foi possível em três amostras
657 de fragmentos de rim, SNC e fígado. Em todas houve 99,3% similares a *Leptospira*
658 *interrogans* no BLAST (Figura 1).

659 Quatro dos fetos eram filhos de progenitoras que possuíam DNA de leptospiras apenas no
660 trato urinário e oito eram filhos de progenitoras que possuíam apenas no trato reprodutivo. Os
661 17 restantes provinham de mães que possuíam DNA em ambos.

662 Em um caso gemelar, os dois fetos tiveram resultados discordantes, em que um possuía
663 DNA de leptospiras no pulmão e no outro não houve resultado positivo em nenhum órgão.

664 Foram observadas malformações em três fetos. O primeiro possuía comunicação entre as
665 cavidades oral e nasal (palatoquise), fissura labial e hidropisia, além da aparência levemente
666 ictérica e friável dos órgãos, principalmente na cavidade abdominal (Figura 2). No segundo
667 foram verificados contratura permanente das articulações dos membros torácicos
668 (artrogripose), hipoplasia do osso mandibular (micrognatia), incompleto fusionamento medial
669 do osso palatino, com comunicação entre as cavidades oral e nasal (palatoquise), hipoplasia
670 unilateral do osso incisivo com descontinuidade do lábio superior (queilosquise) e curvatura
671 lateral da coluna vertebral cervical (escoliose) (Figura 3). No terceiro o encéfalo estava
672 aumentado de tamanho e com consistência mais flácida, onde ao corte, observaram-se os
673 ventrículos laterais distendidos pelo acúmulo de 160 mL de LCR (líquido cefalorraquidiano),
674 com consequente adelgaçamento das substâncias branca e cinzenta (por compressão),
675 características compatíveis com hidrocefalia não comunicante, contratura permanente das
676 articulações dos membros torácicos (artrogripose), hipoplasia do osso mandibular
677 (micrognatia), incompleto fusionamento medial do osso palatino, com comunicação entre as
678 cavidades oral e nasal (palatoquise) e hipoplasia bilateral do globo ocular (microftalmia)
679 (Figura 4).

680 **4. Discussão**

681 Diante dos resultados encontrados, foi evidenciada uma alta frequência de transmissão
682 vertical de *Leptospira* sp. na espécie ovina, as quais foram capazes de atingir uma grande
683 gama de órgãos vitais nos fetos. Este resultado foi mais considerável no período seco,
684 demonstrando que este tipo de transmissão é uma via de disseminação alternativa do agente.

685 A placenta de ovelhas é do tipo sindesmocorial [38], sendo nos cotilédones o contato mais
686 íntimo entre progenitora e feto, em que células trofoblásticas binucleadas fetais se fundem
687 com células epiteliais uterinas maternas, formando placas trinucleadas, havendo assim
688 separação entre trofoblasto fetal e sangue materno [39]. Mesmo assim foi possível constatar
689 neste estudo a transmissão vertical na espécie, o que pode estar relacionadas a características
690 morfológicas e a própria pluralidade na virulência do agente.

691 Como sugerido por [29], a ausência de aglutininas nos organismos fetais sugere a
692 imaturidade do sistema imune fetal ou baixa sensibilidade das técnicas utilizadas. Devido a
693 esta questão, na presente pesquisa foram utilizado ponto de cortes baixos (10 e 50), elevando
694 assim a sensibilidade e tornando possível a detecção de anticorpos, mesmo que em níveis
695 baixíssimos, assim como a metodologia utilizada por [30].

696 Segundo [19], por conta do tipo de placenta dos ruminantes, anticorpos maternos não
697 transpassam a barreira placentária e assim a detecção de anticorpos em feto indica que há
698 infecção uterina. Caso um feto imunocompetente seja desafiado por agentes infecciosos, o
699 mesmo pode ser capaz de produzir anticorpos, e esta chance aumenta quando mais avançado o
700 período gestacional. Ainda existe a hipótese de que microrganismos causem lesões
701 placentárias, fazendo com que anticorpos maternos tivessem acesso ao feto [29, 40]. Porém,
702 dentre os fetos amostrados no presente estudo, em dois havia a presença de imunoglobulinas
703 mesmo suas progenitoras sendo soronegativas, indicando que os próprios organismos fetais
704 produziram as células de defesa. De acordo com os resultados moleculares, foi visto que estas
705 duas matrizes mães de filhos soropositivos eram portadoras de leptospiras no trato
706 reprodutivo, indicando que as mesmas estavam na fase de leptospirúria e provavelmente não
707 possuíam mais anticorpos detectáveis. O curto período de soroconversão de anticorpos
708 detectáveis na SAM em ovelhas portadoras do agente foi descrito recentemente, o que pode
709 estar envolvido com a própria resistência e uma possível adaptabilidade do agente a espécie
710 ovina, sobretudo as mestiças [41, 42]. É importante ressaltar que a imaturidade imunológica
711 possivelmente foi um fator preponderante para que a maioria dos conceptos, mesmo filhos de
712 mães portadoras do agente, terem sido soronegativos.

713 Devido os escassos estudos sobre a fisiopatogenia reprodutiva da leptospirose na espécie
714 ovina, buscou-se fazer analogia com algumas descobertas em outras espécies animais.
715 Conforme descrito por [43], ao realizar uma infecção leptospírica experimental em cadelas,
716 demonstrou que o agente causou danificação no endométrio, gerando resposta inflamatória e
717 expressão anormal de proteínas da matriz extracelular (MEC), prejudicando o
718 desenvolvimento embrionário e interrompendo a gestação. Sendo assim, constata-se que
719 conseqüentemente à vasculite, há inflamação local (placentite leptospiral), determinando o
720 aborto [43, 44]. Porém, ainda como afirmado anteriormente [45], além da inflamação uterina,
721 não se pode descartar a que as leptospiras podem invadir diretamente o embrião, causando
722 sérios danos, sendo ainda possível a ação conjunta destes dois supostos mecanismos.

723 Em pesquisa com fetos provindos de abatedouro, coletaram 213 amostras da espécie
724 bovina entre o terceiro e o sétimo mês de gestação, porém não detectaram anticorpos, mesmo
725 tendo sido possível o isolamento em duas amostras de rins e uma de fígado [30].
726 Diferentemente de estudos a partir da ocorrência de aborto, em que é comum a detecção de
727 células de defesa no organismo fetal [46]. A presença de anticorpos em fluido fetal de cinco
728 bovinos (5,2%) abortados com idade gestacional média acima de 7 meses também foi relatada

729 [29]. Através da imunoperoxidase foi demonstrado que em 19 (17%) de um total de 108 fetos
730 ovinos abortados havia antígenos leptospirais no pulmão, fígado, rim e baço [47].

731 Embora bastante útil e usual, em alguns casos a sorologia não é uma ferramenta para o
732 diagnóstico definitivo da leptospirose, pois em alguns casos anticorpos produzidos não são
733 detectáveis [48], assim como a maioria dos fetos amostrados nesta pesquisa. Em contrapartida
734 a PCR é uma ferramenta crucial na investigação de transmissão vertical, seja por meio dos
735 envoltórios fetais, do próprio feto em caso de aborto ou abate da matriz. Como anteriormente
736 descrito [49] em um estudo a partir da detecção de DNA leptospiral no suco gástrico de um
737 potro abortado, verificaram que devido o DNA resistir ao pH ácido, a PCR pode ser uma
738 excelente opção para diagnosticar leptospiras neste tipo de material biológico quando os
739 tecidos se encontram em estado de autólise.

740 Por meio de uma infecção experimental em matrizes suínas prenhas, comprovaram que
741 animais podem nascer portadores da infecção leptospírica e não apresentarem nenhuma lesão
742 ou sinal clínico [27]. Contudo, não é possível afirmar que estes fetos ovinos, mesmo aqueles
743 com grande parte dos órgãos positivos na PCR, seriam capazes de concluir o período
744 gestacional sem maiores consequências. Para isso, seria necessário estudos que busquem
745 demonstrar o comportamento fetal frente à infecção por leptospiras e quais fatores
746 influenciam na ocorrência ou não de aborto, como por exemplo, carga bacteriana, tipo de
747 cepa, virulência, momento da infecção, sistema imunológico do feto e confirmação de
748 possível lesão placentária pelas bactérias.

749 As malformações congênitas observadas são semelhantes as descritas anteriormente [50],
750 as quais tem como causa a intoxicação por *Mimosa tenuiflora*. Porém, estas anomalias
751 estruturais e funcionais tem origem multifatoriais, podendo envolver fatores hereditários,
752 agentes infecciosos, plantas tóxicas, deficiências nutricionais e substâncias químicas, contudo
753 não há ligação a causas específicas [51, 52].

754 Há poucos estudos que incluem o diagnóstico de leptospirose na investigação de causas
755 infecciosas de malformações congênitas em fetos. Um estudo retrospectivo [53] de 307 casos
756 de aborto bovino, dos quais em 10 casos (3,3%) foram observadas anomalias congênitas,
757 sendo a artrogripose, *Amorphus globosus* e fenda palatina (palatose) foram as mais
758 frequentes. Amostras renais destes animais foram testadas por imunofluorescência direta para
759 *Leptospira* sp. com anticorpo comercial multivalente na diluição de 1:20, mas foram
760 negativos em todos os casos. Um relato de caso [54] descrevendo malformações congênitas

761 multissistêmicas em um feto bovino abortado, mas não houve resultado positivo no
762 diagnóstico de leptospirose.

763 Nos três casos de malformações relatados na presente pesquisa, não existem evidências
764 suficientes que comprovem a associação destas com envolvimento da leptospirose. Porém, foi
765 possível a detecção de DNA por meio da PCR no fígado e baço do primeiro feto; baço,
766 aparelho reprodutor e SNC do segundo feto; aparelho reprodutor e fígado do terceiro, com
767 sequenciamento deste último órgão comprovando a presença de agentes leptospíricos nestes
768 animais. No entanto, não se pode descartar totalmente a possível influência das leptospiras na
769 dinamização da formação destas anomalias. Sendo assim, os resultados apresentados nesta
770 pesquisa instigantes à realização de pesquisas que elucidem melhor ação das leptospiras no
771 ambiente uterino gravídico.

772 **5. Conclusão**

773 Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que a transmissão vertical é uma
774 importante via alternativa de disseminação do agente. Porém, a fisiopatogenia reprodutiva da
775 leptospirose precisa ser melhor elucidada, principalmente tratando-se de úteros gravídicos,
776 pois há um déficit de dados que esclareçam a ação direta e indireta das leptospiras no feto.
777 Além disso, pode-se perceber que a PCR é uma ferramenta essencial na investigação de
778 leptospirose em fetos.

Financiamento

Este trabalho foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Aprovação ética e consentimento para participar

O estudo foi aprovado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por apoiar este projeto através dos protocolos 100-2018, 302222/2016-2 e 423836/2018-8. O consentimento informado por escrito foi obtido de todos os participantes antes da inscrição no estudo.

Contribuições dos autores

DBN e SSA planejaram e projetaram o estudo. DBN, FTRC, RRS, IFFV, NNCB e BMRF realizaram as coletas dos materiais. DBN, FTRC, RRS, IFFV, NNCB, BMRF, MLCRS, DFC, JPAJ, CDM e LSU realizaram testes e análises sorológicas e moleculares. DBN e SSA

gerenciaram o projeto. SSA, CJA e MLCRS supervisionaram o projeto. DBN, DFC, CJA e SSA realizaram a redação.

Declaração de contribuição de autoria

Denise Batista Nogueira: Conceitualização, Visualização, Análise Formal, Investigação, Metodologia, Análise Formal, Software, Recursos, Redação - rascunho original, Redação - revisão e edição. **Flávia Teresa Ribeiro da Costa:** Investigação, Metodologia, Análise Formal, Software, Recursos, Redação - revisão e edição. **Rafael Rodrigues Soares:** Investigação, Metodologia, Análise Formal, Software, Recursos, Redação - revisão e edição. **Igor Felipe Ferreira de Vasconcelos:** Investigação, Metodologia, Análise Formal, Software, Recursos, Redação - revisão e edição. **Nathanael Natércio da Costa Barnabé:** Investigação, Metodologia, Análise Formal, Software, Recursos, Redação - revisão e edição. **Brunna Muniz Rodrigues Falcão:** Investigação, Metodologia, Análise Formal, Software, Recursos, Redação - revisão e edição. **Maria Luana Cristiny Rodrigues Silva:** Investigação, Metodologia, Análise Formal, Software, Recursos, Redação - revisão e edição. **Diego Figueiredo da Costa:** Análise formal, Software, Redação - revisão e edição. **João Pessoa Araújo Júnior:** Análise formal, Software, Redação - revisão e edição. **Camila Dantas Malossi:** Análise formal, Software, Redação - revisão e edição. **Leila Sabrina Ullmann:** Análise formal, Software, Redação - revisão e edição. **Clebert José Alves:** Conceitualização, Visualização, Análise formal, Captação de recursos, Redação - revisão e edição. **Sérgio Santos de Azevedo:** conceitualização, visualização, análise formal, aquisição de recursos, redação - revisão e edição.

Declaração de interesse concorrente

Os autores declaram que não têm interesses concorrentes.

Referências

- [1] A.A. Simplício, Caprinocultura e Ovinocultura de corte no Brasil: pontos para reflexão. *Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária*, 17 (2011), 27–36.
- [2] W.A. Ellis. Animal leptospirosis. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015; 387:99–137
- [3] H.A. Libonati, G.B. Santos, G.N. Souza, et al., Leptospirosis is strongly associated to estrus repetition on cattle. *Trop. Anim. Health Prod.* 50 (2018) 1625-1629
<http://dx.doi.org/10.1007/s11250-018-1604-9>

- [4] S. Faine, B. Adler, C. Bolin, et al., *Leptospira and leptospirosis*. 2nd ed. Med Sci, Melbourne. (1999) 272
- [5] M.D. Givens, A clinical, evidence-based approach to infectious causes of infertility in beef cattle. *Theriogenology*. 66 (2006) 648–654.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.04.021>
- [6] G. Martins, B. Penna, C. Hamond, et al., Leptospirosis as the most frequent infectious disease impairing productivity in small ruminants in Rio de Janeiro, Brazil. *Trop. Anim. Health Pro.* 44 (2012) 773–777.
- [7] P.N. Acha, B. Szyfres, *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales.*, 2.ed. Washington: Organizacion Panamericana de La Salud. (2003) 112-120.
- [8] T. Hairgrove, Leptospirosis in cattle. *AABP Proceedings*. 37 (2004).
- [9] F.S. Magajevski, R.J.S. Girio, L.A. Mathias, et al., Detection of *Leptospira* spp. in the semen and urine of bulls serologically reactive to *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *Braz. J. Microbiol.* 36(2005):43–47. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822005000100009>
- [10] A. Director, B. Penna, C. Hamond, et al., Isolation of *Leptospira interrogans* Hardjoprajitno from vaginal fluid of a clinically healthy ewe suggests potential for venereal transmission. *J. Med. Microbiol.* 63 (2014) 1234–1236.
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.065466-0>
- [11] B.C. Pires, J.B. Grapiglia, L. Moreira, et al., Occurrence of uterine carriers for *Leptospira interrogans* on slaughtered cows. 114 (2018) 163-165.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.11.056>
- [12] A.F. Silva, P.J.A. Farias, M.L.C.R. Silva, et al. High frequency of genital carriers of *Leptospira* sp. in sheep slaughtered in the semi-arid region of northeastern Brazil. *Trop Anim Health Prod.* 51 (2018) 43. <https://doi.org/10.1007/s11250-018-1657-9>
- [13] O.M. Radostits, C.C. Gay, D.C. Blood, et al. *Clínica Veterinária - Um tratado de doenças de bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos*. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. (2002) 1737.
- [14] A. Cortez, A.M.G. Castro, M.B. Heinemann, et al., Detection of *Brucella* spp., *Leptospira* spp., bovine herpesvirus and bovine viral diarrhoea virus nucleic acids in aborted fetuses and bovines dead perinatal. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 58 (2006) 1226-1228.
- [15] C. Hamond, G. Martins, W. Lilenbaum, Rapid and efficient diagnosis of leptospirosis in an aborted foal by PCR of gastric juice. *Veterinary Microbiology*. 160 (2012) 274–275.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.05.030>
- [16] N.A.B. Antoniassi, G.D. Juffo, A.S. Santos, et al., Causas de aborto bovino diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da UFRGS de 2003 a 2011. *Pesq. Vet. Bras.* 33(2013) 155-160.

- [17] H. Langoni, L.C. Souza, A.V. Silva, et al., Incidence of leptospiral abortion in Brazilian dairy cattle. *Preventive Veterinary Medicine* 40 (1999) 271–275
- [18] B. Adler, B. Leptospira and Leptospirosis. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 387 (2015) 293. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8>
- [19] M.J. Yaeger, L.D. Holler Bacterial causes of bovine infertility and abortion, (2007) 389-398. In: Youngquist R.S. & Threlfall W.R. (Eds), *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. 2nd ed. W.B. Saunders, Philadelphia. <https://doi.org/10.1016/B978-072169323-1.50052-0>
- [20] W.A. Ellis. Leptospirosis. In: Straw, B.E.; Zimmerman, J.J.; D'allaire, S.; Taylor, D.J. *Diseases of Swine*, 10 Ed. Blackwell Publishing:Iowa, (2012) 2818- 2849.
- [21] D. Otaka, B. Penna, G. Martins, et al., Rapid diagnostic of leptospirosis in an aborted bovine fetus by PCR in Rio de Janeiro, Brazil. *Vet. Microbiol.* 162 (2013) 1001–1002. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.11.037>
- [22] C.A. Pescador, L.G. Corbellini, A.P. Loretto, et al., Aborto equino por *Leptospiras* sp. *Cienc. Rural*, Santa Maria. 34 (2004) 271-274.
- [23] J.M. Donahue, B.J. Smith, K.J. Redmon, et al., Diagnosis and prevalence of leptospira infection in aborted and stillborn horses. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3 (1991) 148-151.
- [24] R. Atxaerandio, G. Aduriz, I. Ziluaga, J.I. Esteban, L. Maranda, R.C. Mainar-Jaime. Serological evidence of *Leptospira interrogans* serovar Bratislava infection and its association with abortions in cattle in northern Spain. *Veterinary Record*. 156 (2005) 376–380. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.156.12.376>.
- [25] M.F. Cárdenas-Marrufo, I. Vado-Solis, C. Pérez-Osorio, et al., A cross sectional study of leptospirosis and fetal death in Yucatan, Mexico. *Colomb. Med. (Cali)*. 47(2016) 11-14.
- [26] A.A. Tonin, B. Martins, R.V.M.S. Zago, et al. Outbreak of leptospirosis: reproductive losses in sheep. *Comp. Clin. Pathol.* 24 (2015) 961–965. <https://doi.org/10.1007/s00580-014-2056-x>
- [27] F.R.M. Soto, S.S. Azevedo, Z.M. Moraes, et al., Detection of leptospire in clinically healthy piglets born from sows experimentally infected with *Leptospira interrogans* serovar Canicola. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37(2006) 582-586. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000400034>
- [28] F.J. Guitián, F.J. García-Peña, J. Oliveira, et al., Serological study of the frequency of leptospiral infections among dairy cows in farms with suboptimal reproductive efficiency in Galicia, Spain. *Vet. Microbiol.* 80 (2001) 275-284.
- [29] D. P. Moore, C.M. Campero, A.C. Odeón, et al., Humoral immune response to infectious agents in aborted bovine fetuses in Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.* 35 (2003) 143–148.
- [30] F.S. Magajevski, R.J.S. Girio, L.A. R.B. Meirelles, Pesquisa de *Leptospira* em fetos de vacas abatidas no estado de São Paulo, Brasil. *Arq. Inst. Biol.* 74 (2007) 67–72.

- [31] BRASIL, 2017. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/noticias/diariooficial-publica-decreto-do-novo-regulamento-de-inspecao-industrial-e-sanitaria>.
- [32] OIE. (2014). Leptospirosis. Chapter 2.1.12. In OIE Terrestrial Manual. Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2014.
- [33] C. Hamond, G. Martins, A.P. Loureiro, et al., Urinary PCR as an increasingly useful tool for an accurate diagnosis of leptospirosis in livestock, *Vet. Res. Commun.* 38 (2014) 81–85. <https://doi.org/10.1007/s11259-013-9582-x>
- [34] R.A. Stoddard, J.E. Gee, P.P. Wilkins, et al., Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 64 (2009) 247–255. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.03.014>
- [35] A.R. Platt, R.W. Woodhall, A.L.Jr. George, Improved DNA sequencing quality and efficiency using an optimized fast cycle sequencing protocol. *BioTechniques.* 43 (2007) 58–62. <http://dx.doi.org/10.2144/000112499>
- [36] M. Gouy, S. Guindon, O. Gascuel, SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol and Evol.* 27 (2010) 221–224. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msp259>
- [37] T.A. Hall. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41 (1999) 95–98.
- [38] G. Entrican, N.M. Wheelhouse. Immunity in the female sheep reproductive tract *Vet. Res.* 37 (2006) 295-309.
- [39] J.S. Barry, R.V. Anthony, The pregnant sheep as a model for human pregnancy. *Theriogenology*, 69 (2008) 55-67.
- [40] R.D. Schultz, Developmental aspects of the fetal bovine immune response: a review. *Cornell Vet.* 63 (1973) 507- 535.
- [41] D.F. Costa, A.F. Silva, A.W.L. Brasil, A.P.P. Loureiro, F.A. Santos, S.S. Azevedo, W. Lilenbaum, C.J. Ales. Leptospirosis in native mixed-breed sheep slaughtered in a semiarid region of Brazil. *Cienc. Rural.* 47 (2017) e20160563. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20160563>
- [42] D.F. Costa, M.L.C.R. Silva, G. Martins, A.F.M. Dantas, M.A. Melo, S.S. Azevedo, W. Lilenbaum, C.J. Ales. Susceptibility among breeds of sheep experimentally infected with *Leptospira interrogans* Pomona serogroup. *Microb Pathog.* 122 (2018) 79–83. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.06.017>

- [43] W. Wang, X. Gao, M. Guo, et al., *Leptospira interrogans* induces uterine inflammatory responses and abnormal expression of extracellular matrix proteins in dogs, *Microbial Pathogenesis*, 75 (2014) 1–6
- [44] A. Pinna, G. Martins, G. Souza, et al., Influence of Seroreactivity to *Leptospira* and Reproductive Failures in Recipient Mares of Equine Embryo Transfer Programmes. *Reprod. Dom. Anim.* 48 (2013) 55–57 <https://doi.org/10.1111/rda.12166>.
- [45] A.P. Loureiro, W. Lilenbaum. Genital bovine leptospirosis: A new look for an old disease. *Theriogenology*. 141 (2020) 41–47.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.011>
- [46] C.A. Kirkbride, M.W. Johnson. Serologic examination of aborted ovine and bovine fetal fluids for the diagnosis of border disease, bluetongue, bovine viral diarrhoea, and leptospiral infections. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1 (1989) 132-138.
- [47] Y.S. Saglam, Z. Yener, A. Temur, et al., Immunohistochemical detection of leptospiral antigens in cases of naturally occurring abortions in sheep. *Small Ruminant Research* 74 (2008) 119–122
- [48] D.J. Houwer, M.G. Goris, T. Abdoel, et al., Agglutinating antibodies against pathogenic leptospira in healthy dogs and horses indicate common exposure and regular occurrence of subclinical infections. *Vet. Microbiol.* 148 (2011) 449–451.
- [49] C. Hamond, G. Martins, W. Lilenbaum, Rapid and efficient diagnosis of leptospirosis in an aborted foal by PCR of gastric juice. *Veterinary Microbiology*. 160 (2012) 274–275.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.05.030>
- [50] A.F.M. Dantas, Riet-Correa. F, R.M.T. Medeiros, et al., Malformações congênitas em ruminantes no semiárido do Nordeste Brasileiro. *Pesq. Vet. Bras.* 30 (2010) 807-815.
- [51] O.M. Radostits, C.C. Gay, K.W. Hinchcliff, et al., *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. 10th ed. Saunders Elsevier, Philadelphia, (2007) 132-137.
- [52] A.L. Schild. Defeitos congênitos, (2007) 25-55. In: Riet-Correa, F., Schild, A. L., Lemos, R. A. A., Borges, J. R. J. (Eds), *Doenças de Ruminantes e Equídeos*. Vol.1. 3ª ed. Pallotti, Santa Maria, RS. 722p.
- [53] S.P. Pavarini, L. Sonne, N.A.B. Antoniassi, et al., Anomalias congênitas em fetos bovinos abortados no sul do Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 28 (2008) 149-154.
- [54] D.M. Bassuino, F. Wurster, G.D. Juffo, et al., Congenital Multisystemic Malformations in an Aborted Bovine Fetus. *Acta Scientiae Veterinariae*. 40 (2012) 1064.

Material biológico	Período seco		Período chuvoso	
	Número total de amostras	Número de amostras positivas (%)	Número total de amostras	Número de amostras positivas (%)
Fluido peritoneal	11	01 (9,09)	11	02 (18,1)
Conteúdo estomacal	12	06 (50)	13	01 (7,7)
Pulmão	12	02 (16,7)	13	01 (7,7)
Fígado	12	07 (58,3)	12	02 (16,7)
Baço	12	03 (25)	13	04 (30,8)
Rim	12	06 (50)	13	03 (23,1)
Aparelho reprodutor	12	06 (50)	13	02 (15,4)
Sistema nervoso central	14	09 (64,3)	15	04 (26,7)
Ovóide córmico	02	02 (100)	02	00 (00)
Bexiga	-	-	03	00 (00)
Urina	-	-	02	00 (00)
Total (%)	99	42 (42,4)	110	19 (17,3)

Tabela 01. Resultados da PCR em órgãos de fetos coletados no período seco e chuvoso no Nordeste do Brasil, 2018 e 2019

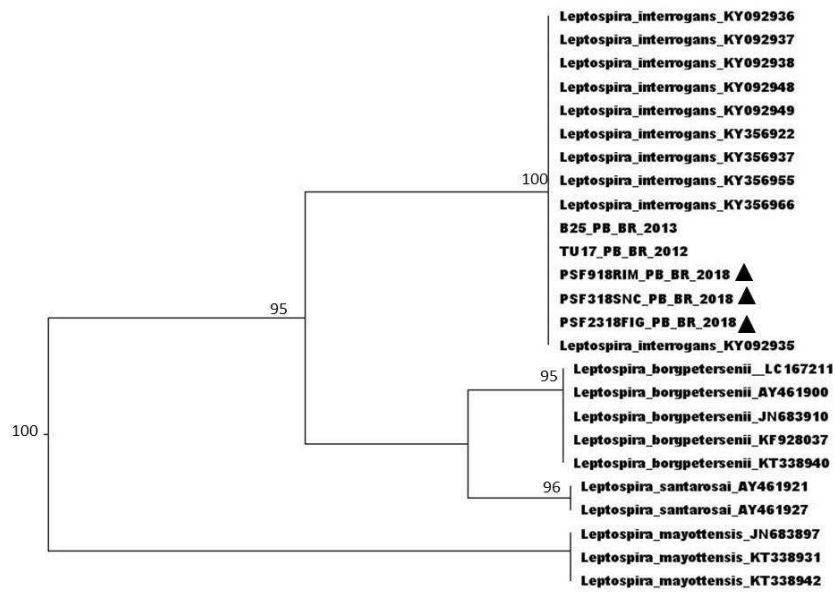


Figura 01. Árvore filogenética construída pelo método de vizinhança e modelo Jukes-Cantor, autoinicialização com 1.000 repetições. ▲ ■ Amostras sequenciadas



Figura 02. Feto malformado apresentando palatrosquise, fissura labial e hidropisia.



Figura 02. Feto malformado apresentando artrogripose, micrognatia, palatosquise, queilosquise e escoliose.



Figura 03. Feto malformado apresentando consistência flácida no encéfalo, acúmulo de LCR, artrogripose, micrognatia, palatosquise e microftalmia.

CONCLUSÃO GERAL

779 Os achados nesta pesquisa comprovam a importância de estudos mais aprofundados
780 para o melhor entendimento da fisiopatogênese da leptospirose genital, pois foi demonstrado
781 que assim como ocorre no sistema urinário, as leptospiras também têm tropismo pelo aparelho
782 reprodutor, o qual atua como local de replicação do agente. Podendo assim desencadear a
783 transmissão venérea e vertical, evidenciando o papel da fêmea como agente de propagação da
784 doença, sendo este aspecto crucial para análise da epidemiologia principalmente em regiões
785 semiáridas, onde a via de transmissão através do sistema reprodutivo é um meio alternativo de
786 disseminação. Também foi exposto a indispensável função da PCR na detecção de leptospiras
787 em ovelhas e fetos carreadores deste agente. Além disso, a sorologia mostrou maior eficácia
788 quando realizada a partir do título 50 na identificação de animais portadores em condições
789 semiáridas em comparação com o título 100, normalmente usado em sorologia para
790 leptospirose.