



**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**

**Rafael Rodrigues Soares**

**Isolamento e Diagnóstico Molecular de *Leptospira spp.* a partir do Trato  
Geniturinário de Pequenos Ruminantes do Semiárido Brasileiro**

**PATOS - PB  
2022**

Rafael Rodrigues Soares

**Isolamento e Caracterização Molecular de *Leptospira* spp. a partir do Trato Geniturinário de Pequenos Ruminantes do Semiárido Brasileiro**

Tese 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 Doutor em Ciência e Saúde Animal

Prof. Titular Dr. Clebert José Alves

Orientador

**Patos - PB**

**2022**

S676i

Soares, Rafael Rodrigues.

Isolamento e caracterização molecular de *Leptospira spp.* a partir do trato geniturinário de pequenos ruminantes do semiárido brasileiro / Rafael Rodrigues Soares. – Patos, 2022.

91 f. : il.

Tese (Doutorado em Ciência e Saúde Animal) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2022.

"Orientação: Prof. Dr. Clebert José Alves".

Referências.

1. Patologia Animal. 2. Sorologia. 3. Trato Geniturinário – Pequenos Ruminantes – Semiárido. 4. Isolados. 5. Venérea. 6. Ponto de Corte. 7. Leptospirose (*Leptospira spp.*). I. Alves, Clebert José. II. Título.

CDU 591.2:616-022.39:636.09 (043)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE**  
POS-GRADUACAO EM CIENCIA E SAUDE ANIMAL  
Rua Aprígio Veloso, 882, - Bairro Universitario, Campina Grande/PB, CEP 58429-900

## FOLHA DE ASSINATURA PARA TESES E DISSERTAÇÕES

**RAFAEL RODRIGUES SOARES**

### ISOLAMENTO E DETECÇÃO MOLECULAR DE *Leptospira spp.* A PARTIR DO TRATO GENITURINÁRIO DE PEQUENOS RUMINANTES DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Saúde Animal como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência e Saúde Animal.

Aprovada em: 24/02/2022

#### BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Clebert José Alves (Orientador - PPGCSA/UFCG)  
Prof. Dr. Sergio Santos de Azevedo (Examinador Interno - PPGCSA/UFCG)  
Prof. Dr. Marcos Bryan Heinemann (Examinador Externo - UFP)  
Prof. Dr. Helder de Moraes Pereira (Examinador Externo - UEMA)  
Dr. Diego Figueiredo da Costa (Examinador Externo - UFPB)

#### OBSERVAÇÕES:

1 - Por não possuírem cadastro como usuários externos no SEI, os examinadores Marcos Bryan Heinemann, Helder de Moraes Pereira da Costa receberão cópia do presente documento e darão ciência e aprovação dos termos por e-mail.

2 - Os examinadores internos signatários certificam que os examinadores externos acima identificados participaram da defesa da tese e tomaram conhecimento do teor deste documento.



Documento assinado eletronicamente por **SERGIO SANTOS DE AZEVEDO, COORDENADOR(A) ADMINISTRATIVO(A)**, em 24/02/2022, às 18:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



Documento assinado eletronicamente por **CLEBERT JOSE ALVES, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 24/02/2022, às 18:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



Documento assinado eletronicamente por **DIEGO FIGUEIREDO DA COSTA, Usuário Externo**, em 25/02/2022, às 10:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.ufcg.edu.br/autenticidade>, informando o código verificador **2139374** e o código CRC **70067ACF**.

---

*“Tudo o que acontece de ruim na  
vida da gente é pra melhorar”  
(Candinho)*

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, que é a inteligência suprema do Universo, a causa primária de todas as coisas; é eterno, infinito, imutável, imaterial, único, onipotente, soberanamente justo e bom.

Aos meus pais, que são verdadeiros alicerces. Carregaram pra si a difícil missão de desenvolver seus filhos pela educação, e também pelo amor condicional. São momentos de abdicção, de esforços, de noites sem sono e de muito apoio. “Deus colocou o filho sob tutela dos pais, a fim de que estes o dirijam pela senda do bem” (Allan Kardec, O Livro dos Espíritos, 1857). Posso dizer que sou reflexo de vocês e jamais conseguiria conquistar tudo o que conquistei. Não existe retribuição maior que seguir este mandamento: Honra a teu pai e a tua mãe.

Aos meus irmãos, Robson e Daniela, que vão além do parentesco corporal; são parentes espirituais ligados por suas vidas passadas, por fidelidade e amor incondicional. Contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional, por meio de sacrifícios e abdicções.

A todos os familiares e parentes que estiveram presentes, a citar: avós Conceição e Ozeny. Avós Francisco e Artur. Tias-avós Agenora e Arlete. Tios Artur, Evandro, Ribamar. Tias Norma e Miriam. Primos: Leonardo, Tiago, Álvaro, Artur Neto. Primas: Lorena, Luana, Tássia, Tatiana e Larissa. A família é um lugar abençoado. Instituto divino. Associação mais importante em sua função educadora e regenerativa. Ame-se, confie em si mesmo, em sua família e ajude a criar um ambiente de amor e paz ao seu redor.

Aos professores Hamilton e Helder, grandes amigos, pois, graças a eles, pude dar os primeiros passos na ciência, através da iniciação científica e do mestrado. Por confiarem até hoje em meu potencial, estando sempre ao meu lado quando preciso. Ao professor Ferdinand pelo apoio durante minha jornada e à professora Ana Clara, que me ajudou durante o processo do doutorado. Todos eles professores da minha amada Universidade Estadual do Maranhão.

Ao professor Clebert, meu orientador do doutorado. Nos conhecemos em um período turbulento e mesmo assim viu potencial em mim, aceitando me orientar nessa etapa tão árduo e extenuante. Aos professores Silvano e Sérgio que me acolheram de igual forma, confiando a mim conhecimentos e práticas que junto com os demais citados, ajudaram a forjar em mim o senso crítico e analítico.

A todos que conheci durante minha jornada do doutorado: Clécio, Aldenir e Nathanael, amigos os quais compartilharam comigo momentos de aprendizado e de glórias. Diego, Luana, Devedê, Maíra, Denise, Flávia, Davidianne, Igor e Deivyson, que ajudaram durante toda a caminhada. Aos funcionários: Dona Francinete, Jonas, Adalberto, Adalgisa e Michele pelas atitudes positivas e por serem pessoas extraordinárias. Foi uma honra trabalhar ao lado de pessoas maravilhosas, companheiras e generosas. Continuem assim e o futuro de todos será brilhante.

Aos amigos, sejam novos ou antigos: Francisco, Richerlieny, Cosmo. Em especial Paulinha, pessoa de riso leve e coração magnânimo. “Ser amigo é uma arte. Saber ser amigo é um dom. Por que o homem não medita o quão amigo é, ou poderia ser, do seu semelhante? Entender o que é e o que significa amizade é um bom passo na solução dos problemas cotidianos que o cercam” (Cairbar Schutel, Fundamentos da Reforma Intima, 1999). A riqueza espiritual da amizade nos aproxima uns dos outros com o desejo sincero de amar e servir, ajudar e edificar para a felicidade que todos almejamos.

Por fim, mas não menos importante, agradeço a todos aqueles que, porventura, não tiveram os nomes citados. Não significa que não tiveram papel relevante, pelo contrário, são pessoas que também habitam meu coração. E é isso que importa.

Obrigado.



## RESUMO

A leptospirose é uma enfermidade amplamente difundida no Brasil, cujo principal impacto é o comprometimento do desempenho reprodutivo dos rebanhos. A presente Tese foi composta de três capítulos que objetivaram a detecção sorológica, molecular e bacteriológica de *Leptospira* spp. em fluidos e órgãos do trato geniturinário de caprinos e ovinos mantidos sob condição de clima semiárido. No capítulo I foram amostrados 40 carneiros, cinco (12,5%) foram positivos com título de anticorpos de 50 e 2 (5%) para o título de 100 para os serogrupos Pyrogenes, Ballum, Icterohaemorrhagiae e Australis. O DNA de *Leptospira* spp. foi encontrado em 30 (75%) animais, com 93 (77,5%) amostras positivas, sendo 48/120 (40%) do trato urinário e 45/120 (37,5%) do genital, sem diferença estatística. Uma amostra de *Leptospira* oriunda da bexiga foi sequenciada e mostrou 99% de similaridade com *L. interrogans*. Das 240 culturas, 59 (24,5%) apresentaram crescimento de *Leptospira* spp. Destas, 23 (39%) foram confirmadas na PCR. O ponto de corte 50 apresentou maior sensibilidade quando comparado ao de 100. A grande proporção de DNA em órgãos, urina e cultura e o crescimento bacteriano do trato genital reforçam sua importância como sítio extrarrenal e destacam o papel dos carneiros na transmissão venérea, bem como a sensibilidade do ponto de corte 50 sugeriu sua adoção na sorologia. O capítulo II detectou *Leptospira* spp. em 40 caprinos machos. Dados sorológicos apontaram três (7,5%) animais positivos para o sorogrupo Pyrogenes, no ponto de corte 1:50. A respeito do teste molecular, 18 (45%) animais foram positivos, sendo detectado em 25/120 (20,8%) amostras do trato urinário e em 23/120 (19,1%) urinário, sem diferença estatística. Uma amostra de ducto deferente mostrou 99% de similaridade com *L. interrogans*. Ao todo, 240 culturas foram avaliadas e 36 (15%) apresentaram crescimento bacteriano. Destas, 27 (75%) tiveram confirmação do DNA de *Leptospira* spp. Deste modo, a leptospirose se faz presente em um ambiente de condições adversas e que a sua disseminação pode estar ligada à transmissão venérea. No capítulo III, das 40 fêmeas caprinas processadas, duas (5%) foram positivas na sorologia para o sorogrupo Pyrogenes, no ponto de corte 1:50. Total de 29 (72,5%) animais foram positivos no PCR, em 51/160 (31,8%) amostras do trato genital e 34/120 (28,3%) do trato urinário, sem diferença estatística. Crescimento bacteriano foi observado em 35/280 (12,5%) culturas e 9/35 (25,7%) foram positivas no PCR. Duas amostras de útero mostraram 99% de similaridade com *L. interrogans* após o sequenciamento. Deste modo, as cabras mantidas sob condição semiárida foram positivas para *Leptospira*, com amostras positivas tanto do trato urinário quanto do genital, sendo esta a forma alternativa de adaptação e manutenção do agente.

**PALAVRAS-CHAVE:** Sorologia; Isolados; Trato Geniturinário; Semiárido; Venérea; Ponto de Corte.

## ABSTRACT

Leptospirosis is a disease widely spread in Brazil, whose main impact is the impairment of the reproductive performance of herds. This thesis was composed of three chapters that aimed at the serological, molecular and bacteriological detection of *Leptospira* spp. in fluids and organs of the genitourinary tract of goats and sheep kept under semi-arid conditions. In chapter I, 40 sheep were studied, five (12.5%) were positive with an antibody titer of 50 and 2 (5%) with a titer of 100 for the Pyrogenes, Ballum, Icterohaemorrhagiae and Australis serogroups. DNA was found in 30 (75%) animals, with 93 (38.7%) positive samples, 48/120 (40%) from the urinary tract and 45/120 (37.5%) from the genital, with no statistical difference. A bladder sample was sequenced and showed 99% similarity to *L. interrogans*. Of the 240 cultures, 59 (24.5%) showed leptospira growth. Of these, 23 (39%) were confirmed by PCR. The cutoff point of 50 was more sensitive than that of 100. The large proportion of DNA in organs, urine and cultures and the bacterial growth of the genital tract reinforce its importance as an extrarenal site and highlight the possible role of sheep in venereal transmission, as well as the sensitivity of the cut-off point 50 suggested its adoption in serology. Chapter II detected *Leptospira* spp. in 40 male goats. Serological data showed three (7.5%) animals positive for the Pyrogenes serogroup, at the cutoff point 1:50. Regarding the molecular test, 18 (45%) animals were positive, being detected in 25/120 (20.8%) urinary tract samples and in 23/120 (19.1%) urinary tract, with no statistical difference. A vas deferens sample showed 99% similarity with *L. interrogans*. Altogether, 240 cultures were evaluated and 36 (15%) showed bacterial growth. Of these, 27 (75%) had DNA confirmation of *Leptospira* spp. Thus, leptospirosis is present in an environment of adverse conditions and its spread may be linked to venereal transmission. In chapter III, of the 40 goat females processed, two (5%) were positive in the serology for serogroup Pyrogenes, at the cutoff point 1:50. A total of 29 (72.5%) animals were PCR positive, in 51/160 (31.8%) samples from the genital tract and 34/120 (28.3%) from the urinary tract, with no statistical difference. Bacterial growth was observed in 35/280 (12.5%) cultures and 9/35 (25.7%) were PCR positive. Two uterus samples showed 99% similarity with *L. interrogans* after sequencing. Thus, goats kept under semi-arid condition were positive for *Leptospira*, with positive samples from both the urinary and genital tracts, this being the alternative form of adaptation and maintenance of the agent.

**KEYWORDS:** Serology; Isolated; Genitourinary Tract; semiarid; Venereal; Cutoff.

## LISTA DE FIGURAS

### Páginas

#### Capítulo I

---

**FIGURA 1:** Árvore filogenética baseada no alinhamento da sequência de nucleotídeos do gene LipL32 de *Leptospira* sp. construído com base no método Bio Neighbour-Joining e no modelo Jukes e Cantor bootstrap com 1.000 repetições. ▲ Amostra sequenciada da bexiga de um carneiro..... **40**

#### Capítulo II

---

**FIGURA 1:** Árvore filogenética baseada no alinhamento da sequência nucleotídica do gene LipL32 da *Leptospira* sp. construída no modelo de associação de Neighbor com 1.000 repetições. ▲ Amostra do Ducto Deferente sequenciada..... **63**

#### Capítulo III

---

**FIGURA 1:** Árvore filogenética baseada no alinhamento da sequência nucleotídica do gene LipL32 da *Leptospira* spp. construída no modelo de associação de Neighbor com 1.000 repetições. ▲ Amostras do Útero sequenciadas..... **86**

## LISTA DE TABELAS

### Páginas

#### CAPÍTULO I

---

<b>TABELA 1:</b> <i>Leptospira</i> sp. MAT, PCR and bacterial growth results in rams reared in the semiarid region of Brazil according to biological materials.....	41
<b>TABELA 2:</b> <i>Leptospira</i> sp. PCR and bacterial growth results in rams maintained in semiarid conditions according to tract.....	43
<b>TABELA 3:</b> Samples that amplified leptospiral DNA and bacterial growth in rams maintained in semiarid conditions.....	43
<b>TABELA 4:</b> Number of positive and negative animals in the PCR of organs and urine in relation to the titration (MAT).....	44
<b>TABELA 5:</b> MAT sensitivity and specificity in 50 and 100 titers compared to PCR of organ and urine.....	44
<b>TABELA 6:</b> Number of positive and negative animals in the bacterial growth in relation to the titration (MAT).....	45
<b>TABELA 7:</b> MAT sensitivity and specificity in 50 and 100 titers compared to Bacterial Growth.....	45

#### CAPÍTULO II

---

<b>TABELA 1:</b> Resultados de SAM, PCR e crescimento bacteriano de <i>Leptospira</i> sp. em caprinos machos criados na região semiárida do Brasil segundo materiais biológicos.....	64
<b>TABELA 2:</b> Resultados da PCR e do crescimento bacteriano de <i>Leptospira</i> sp. em caprinos machos mantidos em condições semiáridas de acordo com o trato.....	66
<b>TABELA 3:</b> Amostras que amplificaram o DNA de leptospira e o crescimento bacteriano em cabras mantidas em condições semiáridas.....	66

#### CAPÍTULO III

---

---

<b>TABELA 1:</b> Resultados de SAM, PCR e crescimento bacteriano de <i>Leptospira</i> spp. em cabras criadas na região semiárida do Brasil de acordo com materiais biológicos.....	<b>87</b>
<b>TABELA 2:</b> PCR e resultados de crescimento bacteriano para <i>Leptospira</i> spp. em cabras mantidas em condições semiáridas de acordo com o trato...	<b>89</b>
<b>TABELA 3:</b> Amostras que amplificaram o DNA de leptospira e o crescimento bacteriano em cabras mantidas em condições semiáridas.....	<b>89</b>

## SUMÁRIO

Pág.

<b>RESUMO</b> .....	9
<b>ABSTRACT</b> .....	10
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	11
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	12
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	16
<b>Referências</b> .....	18
<b>CAPÍTULO I</b> .....	20
Serological, molecular and bacteriological approaches for detecting <i>Leptospira</i> sp. carrier rams maintained in semiarid conditions.....	20
<b>ABSTRACT</b> .....	22
<b>1. Introduction</b> .....	23
<b>2. Material &amp; Methods</b> .....	25
2.1. <i>Sampling and collection of biological materials</i> .....	25
2.2. <i>Serological test</i> .....	26
2.3. <i>Bacterial isolation</i> .....	26
2.4. <i>Molecular detection of Leptospira sp.</i> .....	27
2.5. <i>Statistical analysis</i> .....	27
<b>3. Results</b> .....	28
<b>4. Discussion</b> .....	29
<b>Ethical approval</b> .....	32
<b>Credit authorship contribution statement</b> .....	32
<b>Declaration of competing interest</b> .....	33
<b>Acknowledgements</b> .....	33
<b>References</b> .....	33
<b>Figures/Tables</b> .....	40
<b>CAPÍTULO II</b> .....	47
Investigação do trato genital como via de transmissão de <i>Leptospira interrogans</i> em caprinos machos criados na região semiárida do Brasil .....	47
<b>Resumo</b> .....	49
<b>Introdução</b> .....	49
<b>Materiais e Métodos</b> .....	51
Coleta de amostras.....	51
Teste sorológico.....	52
Isolamento bacteriano.....	52

Diagnóstico molecular de tecidos, urina e culturas .....	53
Sequenciamento e análise filogenética .....	53
Análise estatística .....	54
<b>Resultados</b> .....	54
<b>Discussão</b> .....	55
<b>Conclusão</b> .....	57
<b>Financiamento</b> .....	58
<b>Declaração de concorrência de interesses</b> .....	58
<b>Aprovação ética</b> .....	58
<b>Reconhecimentos</b> .....	58
<b>Referências</b> .....	58
<b>CAPÍTULO III</b> .....	68
Colonização genital em cabras carreadoras de <i>Leptospira</i> spp. mantidas em condição semiárida.....	68
<b>Resumo</b> .....	70
<b>1. Introdução</b> .....	71
<b>2. Materiais e Métodos</b> .....	72
2.1. Coleta de amostras .....	72
2.2. Teste sorológico.....	74
2.3. Isolamento bacteriano .....	74
2.4. Diagnóstico molecular .....	74
2.5. Sequenciamento e análise filogenética .....	75
2.6. Análise estatística .....	75
<b>3. Resultados</b> .....	75
<b>4. Discussão</b> .....	76
<b>Aprovação ética</b> .....	79
<b>Declaração de contribuição de autoria de crédito</b> .....	79
<b>Declaração de Concorrência de Interesses</b> .....	79
<b>Agradecimentos</b> .....	79
<b>Referências</b> .....	79
<b>CONCLUSÃO GERAL</b> .....	91

## INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil possui grande extensão territorial, oferecendo ótimas condições para a criação de caprinos e ovinos, com um efetivo de aproximadamente 10 696 664 de caprinos e 13 512 739 de ovinos (IBGE, 2019). Grande parte das criações nordestinas de ovinos é apenas de subsistência, onde a produção de ovinos representa uma alternativa alimentar e de renda para os pequenos produtores rurais (GUILHERME *et al.*, 2017).

Embora seja a região com predomínio das criações, o regime de manejo da exploração é predominantemente extensivo e rudimentar, com dependência da vegetação nativa, utilização de raças não especializadas, assistência técnica deficitária, baixo nível de organização e de gestão da unidade produtiva e, sobretudo, carece de controle sanitário efetivo (FARIAS *et al.*, 2019). Neste contexto, o estudo da leptospirose entre estes animais é relevante, devido à ocorrência de problemas da esfera reprodutiva, diminuição da produção de leite e a possibilidade de transmissão do agente para os seres humanos (ADLER, 2015).

A ocorrência de leptospirose está estreitamente vinculada aos fatores ambientais, que podem dar lugar a um foco de infecção, cuja amplitude está na dependência de condições favoráveis, das características do habitat e da presença de animais silvestres (ALVES *et al.*, 1996; GENOVEZ *et al.*, 2006; ESCÓCIO *et al.*, 2010). Os hospedeiros naturais são adaptados a alguns sorovares e por isso favorece a sua manutenção no meio ambiente, podendo atingir, por transmissão indireta, os hospedeiros acidentais, que são infectados de forma acidental, geralmente por espécie diferente (FAINE *et al.*, 2000; ADLER, 2015). Quando um sorovar estiver adaptado a determinada espécie, predomina-se a forma crônica da doença, onde abortamentos, natimortos, nascimento de crias fracas e altas taxas de mortalidade nos primeiros dias de vida são frequentes (MARTINS & LILENBAUM, 2014).

A colonização renal ocorre na maioria dos animais infectados em virtude do agente se replicar e persistir nas células epiteliais dos túbulos renais onde os anticorpos ocorrem em baixos níveis (ZAMORA *et al.*, 1999). Entretanto, estudos demonstraram a presença de *Leptospira* spp. em órgãos do trato genital reforçando o ofício deste sítio extrarrenal na manutenção de leptospirosas (SILVA *et al.*, 2019; NOGUEIRA *et al.*, 2020).

O diagnóstico da leptospirose pode ser realizado por meio de técnicas moleculares, bacteriológicas e sorológicas, sendo recomendada a soroaglutinação microscópica (MAT) quando pretende avaliar a nível de rebanho (OIE, 2014). Em ovinos



e caprinos poucos foram os trabalhos envolvendo PCR e crescimento bacteriano, porém, trabalhos recentes (HIGINO *et al.*, 2010; HAMOND *et al.*, 2014; NOGUEIRA *et al.*, 2020) vêm detectando o código genético e isolamento do agente em sua forma viável, importante para construção de um banco de antígenos autóctones.

Estudo recente (PIMENTA *et al.*, 2019) mostrou que a frequência sorológica de ovinos e caprinos foram 7,5% e 8,5% das amostras da Paraíba, e 13,4% e 6,8% das amostras de Pernambuco, respectivamente. A nível molecular, foram encontrados 77.2% (44/57) e 66.3% (69/104) em ovelhas mantidas sob condição semiárida (SILVA *et al.*, 2019; NOGUEIRA *et al.*, 2020). Em virtude da sua importância, se faz necessário avaliar a situação epidemiológica da leptospirose em pequenos ruminantes.

Deste modo, a Tese é composta de três artigos. O primeiro artigo foi aceito para publicação pela revista *Acta Tropica* (Qualis A1; Fator de Impacto: 2.555) e teve como objetivos determinar as frequências sorológica, molecular e bacteriológica de *Leptospira* sp. em carneiros mantidos em condições semiáridas, bem como avaliar a sensibilidade e especificidade da SAM utilizando ponto de corte 1:50, verificar a importância do trato genital como sítio extrarrenal na infecção por este agente e possibilidade da transmissão venérea. O segundo e o terceiro artigos tiveram como objetivos determinar as frequências sorológica, molecular e bacteriológica de *Leptospira* sp., sendo direcionados para caprinos machos e fêmeas, respectivamente.

## Referências

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

ESCÓCIO, C.; GENOVEZ, M. E.; CASTRO, V. *et al.* Influência das condições ambientais na transmissão da leptospirose entre criações de ovinos e bovinos da região de Sorocaba, SP., **Arquivo do Instituto Biológico de São Paulo**, v.77, n.3, p.371-379, 2010.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C. *et al.* **Leptospira and leptospirosis**. 2 ed. Melbourne: MediSci, 2000. 272p.

FARIAS, A. E. M. DE; ALVES, J. R. A.; ALVES, F. S. F. *et al.* Characterization of goat production systems in five states of northeastern Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, [S.L.], v. 40, n. 63, p. 3691-3707, 2019. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2019v40n6supl3p3691>.

GENOVEZ, M. E.; DEL FAVA, C.; CASTRO, V. *et al.* Effect of *Leptospira* spp serovar Hardjo infection on reproduction of two beef Nelore herds with different serological status. In: **XXIV World Buiatrics Congress, Nice –France**, October 15-19, 2006.

GUILHERME, R. F.; LIMA, M. C.; ALVES, J. R. A. *et al.* Characterization and typology of sheep and goat production systems in the State of Paraíba, a semi-arid region of northeastern Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.38, p.2163-2178, 2017.

HAMOND, C.; MARTINS, G.; LOUREIRO, A. P. *et al.* Urinary PCR as an increasingly useful tool for an accurate diagnosis of leptospirosis in livestock. **Veterinary Research Communications**, v.38, p.81-85, 2014.

HIGINO, S. S. S.; AZEVEDO, S. S.; ALVES, C. J. *et al.* Frequência de Leptospirose em ovinos abatidos no Município de Patos, Paraíba. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, n.3, p.525-527, 2010.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, BRASIL. **Pesquisa da Pecuária Municipal**. 2019. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939>> Acesso em: 14 jan. 2020.

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

NOGUEIRA, D. B.; COSTA, F. T. R.; BEZERRA, C. S. *et al.* Use of serological and molecular techniques for detection of *Leptospira* sp. carrier sheep under semiarid conditions and the importance of genital transmission route. **Acta Trop.** v. 207, p.1-25, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105497>

OIE. World Organization for Animal Health, Leptospirosis, in: **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**, World Organization for Animal Health, Paris, 2014.

PIMENTA, C. L. R. M.; BEZERRA, C. S.; MORAIS, D. A. *et al.* Seroprevalence and predominant serogroups of *Leptospira* sp. in serological tests of ruminants in northeastern Brazil. **Semina: Ciên. Agrár.** v. 40, p.1513-1522, 2019.

SILVA, A. F.; FARIAS, P. J .A.; SILVA, M. L. C. R. *et al.* High frequency of genital carriers of *Leptospira* sp. in sheep slaughtered in the semi-arid region of northeastern Brazil. **Trop. Anim. Health Prod.** v. 51, p.43-47, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11250-018-1657-9>

ZAMORA J; RIEDEMANN S; TADICH N.A. A serological survey of leptosirosis in sheep in chile. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**,v.41, n.2, p.73-76, 1999.

## **CAPÍTULO I**

Serological, molecular and bacteriological approaches for detecting *Leptospira* sp.  
carrier rams maintained in semiarid conditions

Manuscritos publicado no periódico “Acta Tropica”

Volume 213, jan – 2021

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105759>

**Serological, molecular and bacteriological approaches for detecting *Leptospira* sp. carrier rams maintained in semiarid conditions**

Rafael Rodrigues Soares<sup>a</sup>, Nathanel Natércio da Costa Barnabé<sup>a</sup>, Denise Batista Nogueira<sup>b</sup>, Laís Samara Cavalcante da Silva<sup>a</sup>, João Pessoa Araújo Júnior<sup>c</sup>, Camila Dantas Malossi<sup>c</sup>, Leila Sabrina Ullmann<sup>c</sup>, Diego Figueiredo da Costa<sup>d</sup>, Maria Luana Cristiny Rodrigues Silva<sup>b</sup>, Severino Silvano dos Santos Higino<sup>b</sup>, Sergio Santos de Azevedo<sup>b</sup>, Clebert José Alves<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> *Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR), Av. Universitária, s/n, Santa Cecília, Patos, PB 58708-110, Brazil*

<sup>b</sup> *Universidade de São Paulo (USP), Av. Prof. Almeida Prado, 1280, São Paulo, SP 05508-900, Brazil*

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

<sup>d</sup> *Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Centro de Ciências Agrárias (CCA), Rodovia BR 079, Km 02, Areia, PB 58397-000, Brazil*

---

\* Corresponding author

*E-mail address:* clebertja@uol.com.br (C. J. Alves).

## ABSTRACT

Even in the adverse environmental conditions of the semiarid region, leptospire can survive and spread by alternative routes of transmission, such as sexual in ewes, however, there is no data on rams. Thus, the present study aimed to evaluate the use of serological, molecular and microbial tools applied to diagnosis of *Leptospira* sp. Infection in rams maintained in semiarid conditions. Biological samples of urinary (urine, kidney and bladder) and genital (vas deferens, epididymis tail and vesicular gland) tracts were collected from 40 slaughtered rams for polymerase chain reaction (PCR) and bacterial isolation, as well as blood samples for antibody detection through microscopic serum agglutination test (MAT). Anti-*Leptospira* antibodies were found in five (12.5%) animals with antibody titer of 50 and 2 (5%) for the titer 100 for serogroups Pyrogenes, Ballum, Icterohaemorrhagiae and Australis. *Leptospira* sp. DNA was found in PCR of organs and urine of 30 (75%) animals. Overall, 240 fragments of organs from the urinary and genital tracts and urine were evaluated, with 93 (38.7%) positive samples, being 48/120 (40%) for the urinary tract and 45/120 (37.5%) for the genital. There was no statistically significant difference between the tracts. A bladder sample was sent for sequencing and showed 99% similarity with *L. interrogans*. Of the 240 cultures evaluated, 59 (24.5%) had leptospire growth, being that 23 (39%) were confirmed in PCR. Considering the PCR of organs and urine and bacterial growth as gold standards, the cut-off 50 in MAT showed greater sensitivity when compared to cut-off 100, regardless of the material used. The great proportion of leptospiral DNA in organs, urine and culture and bacterial growth from the genital tracts reinforce its importance as an extrarenal site and highlights the possible role of rams in venereal transmission, as well as the sensitivity of the cut-off 50 suggested its adoption in the serology of rams maintained in semiarid conditions.

*Keywords:* Animal leptospirosis, Small ruminants, Genital leptospirosis, Molecular detection, Cut-off 50, Epidemiology.

## 1. Introduction

Leptospirosis is a disease caused by bacteria of the genus *Leptospira* that affects several animal species and humans (Adler and Moctezuma, 2010), causing great economic losses on livestock and public health concerns (Ellis, 2015). The animals, especially wild and synanthropic rodents, can become carriers and contribute to the spread of the agent (Picardeau, 2013), and infection can occur through contact with urine, which contaminates water environment and soils, as well as contact with vaginal fluids and placenta, which keeps the incidence of infection constant and consequently leading to endemic situations that are difficult to control (Thibeaux et al., 2018). Epidemiological surveys have shown that the disease in sheep is related to serovars Hardjo, Autumnalis, Pomona, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae and, mainly, Serjoe, being the main responsible for clinical conditions of miscarriages, birth of weak lambs, repetition of heat and decreased milk production (Alves et al., 2012; Ellis, 2015). Nevertheless, it remains a neglected disease and the extent of its effects on herds is unknown, especially in the Brazilian semiarid region, where sheep farming is one of the most explored activities, mainly in terms of subsistence, but which needs changes, such as intensifying research, organizing livestock and acquiring new technologies (Costa et al., 2017; Farias et al., 2019).

Recent studies in ewes have demonstrated the presence of *Leptospira* sp. in organs of the genital tract reinforcing the role of this extrarenal site in the maintenance of leptospires (Silva et al., 2019; Nogueira et al., 2020b). Studies have shown that genital leptospirosis syndrome is no longer a consequence of renal colonization, mainly due to vaginal immune response, experimental infection by uterine inoculation, some strains preferentially colonize the genital tract and the possibility of sexual transmission of leptospires from female to male, presence of the agent in semen and vaginal fluid samples and vertical transmission (maternal-fetal) (Loureiro and Lilenbaum, 2020; Nogueira et al., 2020a). In cattle, bulls can carry leptospires in the seminal vesicles, making venereal transmission an essential way of dissemination and a well-established route (Ellis et al., 1986). Leptospires and its DNA have already been detected in the genital tract of ewes (Nogueira et al., 2020b), however, the role of rams in genital transmission is still uncertain, with data showing only the detection of *Leptospira* DNA in semen samples

(Lilenbaum et al., 2008). Therefore, there is a need for a more comprehensive study, involving other organs of the genital tract of rams.

In environments where the disease is endemic, asymptomatic animals are common, and these carriers are the most important from the epidemiological point of view (Almeida et al., 2019). In that case, it is important to establish a serology testing protocol that best fits the region studied, such as using most frequent serovars as antigens and reducing the cut-off point in order to increase sensitivity and, therefore, decrease the number of false negative results. In the Brazilian semiarid region, some studies have shown that sheep, especially crossbred, have greater resistance to infection and a short period of seroconversion (Costa et al., 2018). Nogueira et al. (2020b) reported that cut-off 50 in serology is the most suitable in ewes, however, there are no reports for rams. The microscopic serum agglutination test (MAT) is useful for screening in herds, however, the occurrence of carrier animals that do not seroconvert is common (Azevedo et al., 2004; Lilenbaum et al., 2008; Otaka et al., 2012; Silva et al., 2019; Nogueira et al., 2020b). At this point, the association between molecular techniques and bacterial isolation makes the diagnosis more reliable, being able to identify carrier animals with negative results in serology, increasing sensitivity and specificity (Director et al., 2014; Silva et al., 2019).

The Brazilian semiarid region has particularities that are not found in other regions of Brazil, such as annual average rainfall of less than 500 mm, cohabitation with a rich wild fauna, dry season that can last for more than a year, vegetation with thorns and very few leaves and high solar radiation, leading to a high evaporation rate and consequent drop in soil water availability (Araújo, 2011). Even with all this adversity, studies have demonstrated the persistence of infection in ewes from this region (Costa et al., 2017; Silva et al., 2019; Nogueira et al., 2020b). However, there are gaps regarding the dynamics of *Leptospira* sp. in the organs of the urinary tract and, mainly, genital tract, where there is no broad understanding of the participation of rams in genital transmission and the possibility of developing exclusive syndrome for this tract. Thus, the present study aimed to evaluate the use of serological, molecular and bacteriological techniques in the diagnosis of *Leptospira* sp. infection in rams maintained in semiarid conditions.



## 2. Material & Methods

### 2.1. Sampling and collection of biological materials

The study was carried out in the municipal slaughterhouse of Patos, semiarid region of Paraíba, Brazil (Latitude: 07° 01' 28" S; Longitude: 37° 16' 48" W). The minimum sample size was determined with the following formula to analyze one proportion (Arango, 2009):

$$n = \frac{p_0 \times q_0 \times \left( z_{1-\beta} + z_{\alpha/2} \times \sqrt{\frac{p_1 \times q_1}{p_0 \times q_0}} \right)^2}{(p_1 - p_0)}$$

where,

$n$  = minimum sample size

$Z_{\alpha/2} = 1.96$  (Z value for the confidence level of 95%)

$Z_{1-\beta} = 1.64$  (Z value for the power of 95%)

$P_0 = 42.8\%$  (reference proportion of PCR-positivity) (Lilenbaum et al., 2008)

$P_1 = 77.2\%$  (estimate of experimental proportion of PCR-positivity) (Silva et al., 2019)

$q_0 = 1 - p_0$

According to these parameters 24 animals were required, however, 40 rams were selected between August and November 2018, which correspond to the dry season. According to data from the National Institute of Meteorology of Brazil (INMET, 2019), the average, maximum and minimum temperatures of that period were 29.3°C, 30.1°C and 28.6°C, respectively. According to information obtained by the Animal Transit Guide provided by the Official Veterinary Service of the State of Paraíba, all animals belonged to different rural properties of the semiarid of Paraíba.

Samples of renal, bladder, vesicular gland, epididymis tail and vas deferens tissues were collected and immediately processed in a room with Bunsen burner and sterile material. They were fragmented through autoclaved surgical materials and sterile blades,

in portions of 1g and 5g, destined for bacterial isolation and molecular diagnosis, respectively, and transferred to DNA- and RNA-free microtubes and stored at -20°C. Urine samples were collected directly from the bladder by puncture with 5 mL sterile syringes, and 100 µl were destined to bacterial isolation and 500 µl in microtubes free of DNA and RNA with 0.5 mL of phosphate-buffered saline.

Blood samples were obtained at the slaughter line during the bleeding using 8 mL properly identified sterile vacuum tubes with coagulation activator. In the laboratory, they were centrifugated at 1,512 g for 10 minutes and the serum was stored at -20 °C, in duplicate, until tests were performed.

## 2.2. *Serological test*

The presence of anti-*Leptospira* sp. agglutinins was determined by MAT (OIE, 2014), using as antigens a collection of 24 serovars belonging to 17 different pathogenic serogroups of five species, originated from the Pasteur Institute, France, and provided by the Veterinary Bacteriology Laboratory of the Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, Brazil: *L. interrogans* serovars Copenhageni, Canicola, Autumnalis, Wolffi, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Kennewicki, Hebdomadis, Pyrogenes, Bratislava and Australis; *L. santarosai* serovars Guaricura, Shermani and Canalzoni; *L. borgpetersenii* serovars Javanica, Tarassovi, Ballum, Mini and Castellonis; *L. kirschneri* serovars Grippotyphosa and Cynopteri; *L. noguchi* serovars Panama and Louisiana. All samples with agglutinating activity > 50% at a 1:50 dilution were considered positive and then titrated at a ratio of two. The use of this cut-off point follows a methodology that showed greater sensitivity in the detection of anti-*Leptospira* antibodies in ewes (Nogueira et al., 2020b).

## 2.3. *Bacterial isolation*

Renal tissue, bladder, vesicular gland, epididymis tail, vas deferens and urine samples were inoculated in semisolid EMJH medium (Difco, BD Franklin, NJ, USA)

witch sulfamethoxazole (0.4 mg/mL), trimethoprim (0.2 mg/mL), amphotericin B (0.05 mg/mL), fosfomycin (0.4 mg/mL) e 5-fluorouracil (0.1 mg/mL) (Chakraborty et al., 2011). The tubes were stored in a BOD incubator at 29°C for 24 hours and, after this stage, they were seeded in EMJH semi-solid and Fletcher (Difco, BD Franklin, NJ, USA) mediums and incubated again in the incubator. The tubes were examined weekly for 12 weeks using dark field microscopy.

#### 2.4. Molecular detection of *Leptospira* sp.

DNA extraction from tissues and cultures was performed with the Dneasy blood & tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany), following the manufacturer's recommendations. Primers LipL32-45F (5'-AAG CAT TAC CGC TTG TGG TG-3') and Lip L32-286R (5'-GAA CTC CCA TTT CAG CGA TT-3') were used to amplify the LipL32 gene, designed by Stoddard et al. (2009), that targets the LipL32 gene, specific for pathogenic leptospires. Sequencing reactions were performed according to the methodology described by Hamond et al. (2014), using the LipL32-45F and LipL32-286R primers (Stoddard et al., 2009) with the Big Dye Terminator v3.1 sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). For capillary electrophoresis, a 3130xL gene analyzer and the POP-7 polymer were used (Platt et al., 2007). The sequence was aligned with *Leptospira* strains obtained from GenBank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), using the BLAST tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). A phylogenetic tree was generated using the software Seaview4 (Gouy et al., 2010) and built using the Bio Neighbor-Joining method and Jukes and Cantor model bootstrap with 1,000 repetitions. This was visualized through FigTree v1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>). Phylogenetic reconstruction included sequences of *Leptospires* for comparison.

#### 2.5. Statistical analysis

The Chi-squared test with Yates' continuity correction was used to compare the proportions of positive animals/samples in PCR and culture of the genital and urinary tracts, with a significance level of 5%, using the BioEstat 5.3 software. Sensitivity and specificity of serology at 50 and 100 cut-off points were calculated using the Dag Stat software (Mackinnon, 2000), considering two gold standard techniques - PCR and culture.

### 3. Results

Of the 40 animals evaluated, the presence of anti-*Leptospira* antibodies was found in five (12.5%) animals (cut-off 50), with reactions for the serogroups Pyrogenes (40%), Ballum (20%), Icterohaemorrhagiae (20%) e Australis (20%). For the cut-off 100, two (5%) animals reacted to the serogroups Ballum (50%) and Icterohaemorrhagiae (50%) (Table 1).

In total, 240 organs and urine samples from 40 animals were tested. Leptospiric DNA was found in tissues and urine of 30 (75%) animals. Of these animals, five had positive results only for the urinary tract, five were positive only for the genital tract and 20 for both tracts. The data regarding bacterial growth shows that 24/40 (60%) animals were positive in the leptospire growth, with seven (17.5%) animals presenting positive samples only for the urinary tract whereas six (15%) for the genital tract (Table 1).

Table 2 shows that *Leptospira* sp. DNA was found in 45/120 (37.5%) samples from the genital tract and in 48/120 (40%) from the urinary tract samples, totaling 93 organs with DNA presence, with no significant difference between tracts ( $P = 0.691$ ). The ascending order of the organs / urine with greater frequency were: 12 urine samples (30%), 15 vas deferens (37.5%), 15 vesicular gland (37.5%), 15 epididymis tail (37.5%), 17 kidney samples (42.5%) and 19 bladder samples (47.5%) (Table 3). When comparing PCR positivity between organs and urine, it was found no statistically significant difference.

Bacterial growth was observed in 59/240 cultures (24.5%), 29/120 (24.1%) for the urinary tract and 30/120 (25%) for the genital tract, with no statistically significant difference ( $P = 0.826$ ) (Table 2). The frequencies per biological material were as follows:

bladder 30% (12/40), vas deferens 30% (12/40), epididymis tail 27.5% (11/40), kidney 25% (10/40), urine 17.5% (7/40) and vesicular gland 17.5% (7/40) (Table 3). The comparison of bacterial growth proportions between biological materials showed no statistically significant difference.

Of the 59 cultures that showed leptospire growth, 23 (39%) had positive PCR results (Table 1). *Leptospira* sp. DNA was found in 12/30 (40%) samples from the genital tract and in 11/29 (38%) from the urinary tract samples (Table 2). According to Table 3, the ascending order was: five epididymis tails (45.4%), five bladders (41.6%), four vesicular glands (57.1%), three urines (42.8%), three kidneys (30%) e three vas deferens (25%).

DNA from a bladder sample was sequenced (Figure 1) and showed 99% similarity with *L. interrogans* in BLAST at Genbank.

Tables 4 and 6 show the relations between the MAT cut-off points (50 and 100) and the number of positive and negative animals in PCR and bacterial growth of organs and urine, respectively. Sensitivity and specificity results of MAT according to cut-off points compared to PCR and bacterial growth are shown in Tables 5 and 7, respectively. The highest MAT sensitivities compared to both PCR and bacterial growth results were obtained with titer 50.

#### **4. Discussion**

Microscopic serum agglutination test is the reference serological test for leptospirosis, although it is subjective, expensive and difficult to implement (Picardeau, 2013). The present work was carried out during the dry period and, despite that, five (12.5%) animals were seroreactive, with four different serogroups.

The presence of Icterohaemorrhagiae, Pyrogenes and Ballum reinforces the possible direct contact of animals with domestic rodents (*Rattus rattus*, *R. norvegicus*) (Adler and Monctezuma, 2010; Costa et al., 2015; Pimenta et al., 2019), in addition to wild rodents (*Kerodon rupestris*, *Cavia aperea*), marsupials (*Didelphis albiventris*), wild canids (*Lycalopex vetulus*), wild felids (*Leopardus wiedii*) and reptiles (*Tupinambis teguixin*) (Silva and Leal, 2017). The Australis serogroup is generally said to be associated

with pigs, however, rodents carry strains of this serogroup (Adler and Monctezuma, 2010). A similar fact was found by Nogueira et al. (2020b), with a variety of serogroups in semiarid environment conditions.

Leptospiric DNA was detected in 75% of the animals, proving to be higher than studies with rams (Farina et al., 1996; Lilenbaum et al., 2008), as well as studies with ewes in other regions of Brazil (Fornazari et al., 2012; Almeida et al., 2019) and in the semiarid region (Costa et al., 2018; Silva et al., 2019). Santos et al. (2011), evaluating sheep breeding and management conditions in the semiarid region, found failures in sanitary, reproductive management and lack of technical assistance. It was also found that the system for raising herds is the extensive type with a male kept close to the animals, favoring natural breeding. The presence of the mentioned risk factors may predispose to the occurrence of leptospirosis, considering the possibility of venereal transmission or contact with abortion products (body fluids, placenta, fetus, blood).

It was possible to verify the leptospires' colonization capacity in all tissues. There was no statistical difference between the genital and urinary tracts, both in PCR and in bacterial growth, suggesting a similar role of both sites. The frequency of findings in the genital tract, although close to the urinary tract, demonstrates that venereal transmission may be an alternative and adapted route for *Leptospira* in rams, where environmental conditions are adverse. As noted by Nogueira et al. (2020b), the nutrition and immunity of animals are impaired due to the scarcity of food and sudden changes in temperature, making them more susceptible to diseases and reproductive disorders, whether metabolic or not.

The collected organs belong to the genital and urinary tracts, the latter being the site overlooked by the agent when it assumes a chronic pattern of infection (Ellis, 2015). *Leptospira* sp. DNA was detected in other organs, such as epididymis tail, vesicular gland and vas deferens, a relevant factor for understanding the mechanisms of evasion and adaptation of this microorganism. Furthermore, it was observed that, of the cultures with bacterial growth, 23 (39%) were positive in the conventional PCR for the *LipL32* gene. It reinforces the possibility of the intraspecies dissemination and distribution of leptospires through venereal route, as already described in previous studies (Lilenbaum et al., 2008; Arent et al., 2013). In addition, this route constantly maintains the incidence of infection, since environmental factors do not influence it (Martins and Lilenbaum, 2014).

The higher frequency of PCR-positivity and bacterial growth in organs of the genital tract highlights its importance as an extrarenal colonization site and, therefore, it should be considered a site of a specific syndrome, and not a consequence of urinary tract bacteremia (Loureiro and Lilenbaum, 2020).

In PCR of organs and urine, five animals presented DNA only for the urinary and the same amount was observed for the genital tract. In bacterial growth, there was a slight difference between tracts, with the urinary showing seven animals and the genital six. Since there are two samples negative in conventional PCR but positive in culture, PCR is not a perfect method to detect *Leptospira* sp. Therefore, a negative result in PCR does not always indicate the absence of the agent in the sample. This demonstrates that, although the urinary and genital tracts have anatomical proximity, there were cases in which the animal had DNA in one tract, but not in the other, as well as for bacterial growth. In PCR of culture this difference was slightly small, with the genital (seven animals) close to the urinary (five animals). This information clarifies the hypothesis raised and observed by other authors that genital infection is exclusive, has its own characteristics and does not depend on the presence of the agent in the urinary tract (Hammond et al., 2014; Nogueira et al., 2020b).

Isolation is an important tool due to its specificity, although it is laborious and with low sensitivity (Ellis, 2015). Cultures that presented leptospire growth show that animals are carriers of the agent and may be contributing to its maintenance in the environment, especially in the semiarid region. Besides that, it is a very important step when it is desired to obtain a bank of autochthonous antigens, which can give greater sensitivity and specificity to the serological diagnosis.

The sequencing of the bladder sample corresponded to the sequences of the species of *Leptospira interrogans*. The sequencing of PCR products is important for the understanding of the strains that circulate in the studied region, as it allows a simple and quick screening of the identification of the specie (Picardeau, 2013; Hamond et al., 2019).

Regarding the titration, the cut-off 50 was more effective in detecting carriers than the 100, taking into account PCR of organs and urine and bacterial growth as gold standards. The same situation was observed by Nogueira et al. (2020b) in ewes maintained in semiarid conditions. The possibility of detecting an animal that is, in fact, hosting the agent in their organism, increases when a protocol is adapted to the studied

region. According to Picardeau (2013), there are regional differences in incidence, related to climatic conditions. The ability to detect infection at the onset of the disease is extremely important to initiate appropriate treatment to avoid serious complications, as well as to prevent its spread to healthy animals.

The great proportion of leptospiral DNA in organs and urine and bacterial growth from the genital tracts reinforce its importance as an extrarenal site and highlights the possible role of rams in venereal transmission, as well as the sensitivity of the cut-off 50 suggested its adoption in the serology of rams maintained in semiarid conditions.

### **Ethical approval**

This research was approved by the Animal Use Ethics Committee (CEUA) of the Federal University of Campina Grande (UFCG) under number 17/2019.

### **Credit authorship contribution statement**

**Rafael Rodrigues Soares:** Conceptualization, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Nathanael Natércio da Costa Barnabé:** Conceptualization, Investigation, Writing - original draft. **Denise Batista Nogueira:** Conceptualization, Investigation, Writing - original draft. **Lais Samara Cavalcante da Silva:** Conceptualization, Investigation. **Diego Figueiredo da Costa:** Conceptualization, Investigation. **Maria Luana Cristiny Rodrigues Silva:** Conceptualization, Investigation, Writing - original draft. **João Pessoa Araújo Júnior:** Investigation. **Camila Dantas Malossi:** Investigation. **Leila Sabrina Ullmann:** Investigation. **Severino Silvano dos Santos Higino:** Writing - original draft, Writing - review & editing. **Sérgio Santos de Azevedo:** Conceptualization, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Clebert José Alves:** Conceptualization, Supervision, Funding acquisition, Writing - original draft, Writing - review & editing.



## **Declaration of competing interest**

The authors declare that they don't have competing interests.

## **Acknowledgements**

We thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the financial support to this study.

## **References**

Adler, B., Moctezuma, A.P., 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, L.W., Estrela-Lima, A., Pinna, M.H., 2019. Investigation of chronic infection by *Leptospira* spp. in asymptomatic sheep slaughtered in slaughterhouse. *PLoS.* 14, 1–13. <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 deslanados do semiárido brasileiro. *Pesq. Vet. Bras.* 32, 523–528. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2012000600009>

Arango, H.G., 2009. Bioestatística teórica e computacional, third ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro

Araújo, S.M.S. 2011. 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\\_nordeste\\_do\\_brasil.pdf](https://www.unirios.edu.br/revistarios/media/revistas/2011/5/a_regiao_semiarida_do_nordeste_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, 1–2. <https://doi.org/10.1136/vr.101969>

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

Campos, A.P., Miranda, D.F.G., Rodrigues, H.W.S., Lustosa, M.S.C., Martins, G.H.C, Mineiro, A.L.B.B., Castro, V., Azevedo, S.S., Silva, S.M.M.S., 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.* 49, 899-907

Carneiro, L.A., Bahia, M.N.M., Pereira, W.L.A., Dias, H.L.T., Costa, A.R.F., 2015. Investigação sorológica, molecular e anatomopatológica para leptospirose em ovinos (*Ovis aries*) procedentes de um biotério de criação. *Rev. Pan-Amaz. Saúde.* 6, 55–61. <https://doi.org/10.5123/s2176-62232015000400008>

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

Costa, F., Wunder, E.A., de Oliveira, D., Bisht, V., Rodrigues, G., Reis, M.G., Childs, J.E., 2015. Patterns in *Leptospira* shedding in Norway rats (*Rattus norvegicus*) from Brazilian slum communities at high risk of disease transmission. *PLoS Neglect. Trop. D.* 9, 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003819>

Costa, D.F., Silva, A.F., Brasil, A.W.L., Loureiro, A.P.P., Santos, F.A., Azevedo, S.S., Lilenbaum, W., Alves, C.J., 2017. Leptospirosis in native mexed-breed sheep slaughtered a semiarid region of Brazil. *Cienc. Rural.* 47, 1–6. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20160563>

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., 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>

Director, A., Penna, B., Hamond, C., Loureiro, A.P., Martins, G., Medeiros, M.A., 2014. 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>

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, 11–30

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

Farias, A.M., Alves, J.R.A., Alves, F.S.F., Pinheiro, R.R., Faccioli-Martins, P.Y., Lima, A.M.C., Azevedo, S.S., Alves, C.J., 2019. Characterization of goat production systems in five states of northeastern brazil. *Semina: Ciênc. Agrár.* 40, 3691-3708. *Pesq. Vet. Bras.* 38, 1344–1350. DOI: 10.5433/1679-0359.2019v40n6Supl3p3691

Farina, R., Cerri, D., Renzoni, G., Andreani, E., Mani, P., Ebani, V., Pedrini, A., Nuvoloni, R., 1996. *Leptospira interrogans* in the genital tract of sheep. Research on ewes and rams experimentally infected with serovar hardjo (Hardjobovis). *New Microbiol.* 19, 235–242

Fornazari, F., Costa da Silva, R., Richini-Pereira, V.B., Beserra, H.E.O., Luvizotto, M.C.R., Langoni, H., 2012. Comparison of conventional PCR, quantitative PCR, bacteriological culture and the Warthin Starry technique to detect *Leptospira* spp. in kidney and liver samples from naturally infected sheep from Brazil. *J. Microbiol. Methods*. 90, 321–326. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.06.005>

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>

Hamond, C., Martins, G., Bremont, S., Medeiros, M.A., Bourhy, P., Lilenbaum, W., 2014. Predominance of *Leptospira interrogans* serovar Bratislava DNA in vaginal fluid of mares suggests sexual transmission of leptospirosis. *Anim. Reprod. Sci.* 151, 275–279. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.10.019>

Hamond, C., Silveira, C.S., Buroni, F., Suanes, A., Nieves, C., Salaberry, X., Zarantonelli, L., 2019. *Leptospira interrogans* serogroup Pomona serovar Kennewicki infection in two sheep flocks with acute leptospirosis in Uruguay. *Transbound. Emerg. Dis.* 66, 1186–1194. <https://doi.org/10.1111/tbed.13133>

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>

Lilenbaum, W., Vargas, R., Brandão, F.Z., Cortez, A., Souza, S.O., Brandão, P.E., 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>

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>

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)

Martins, G., Lilenbaum, W., 2014. 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>

Nogueira, D.B., Costa, F.T.R., Bezerra, C.S., Silva, M.L.C.R., Costa, D.F., Soares, R.R., Barnabé, N.N.C., Falcão, B.M.R., Silva, M.L.C.R., Costa, D.F., Araújo Júnior, J.P., Malossi, C.D., Ullmann, L.S., Alves, C.J., Azevedo, S.S., 2020a. *Leptospira* sp. vertical transmission in ewes maintained in semiarid conditions. *Anim. Reprod. Sci.* 219, 1-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106530>

Nogueira, D.B., Costa, F.T.R., Bezerra, C.S., Silva, M.L.C.R., Costa, D.F., Viana, M.P., Silva, J.D., Araújo Júnior, J.P., Malossi, C.D., Ullmann, L.S., Santos, C.S.A.B., Alves, C.J., Azevedo, S.S., 2020b. Use of serological and molecular techniques for detection of *Leptospira* sp. carrier sheep under semiarid conditions and the importance of genital transmission route. *Acta Trop.* 207, 1-25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105497>

OIE, 2014. Leptospirosis. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*

Otaka, D.Y., Martins, G., Hamond, C., Penna, B., Medeiros, M.A., Lilenbaum, W., 2012. Serology and PCR for bovine leptospirosis: a herd and individual approaches. *Vet. Rec.* 170, 1-2. <https://doi.org/10.1136/vr.100490>

Picardeau, M., 2013. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Med. Mal. Infect.* 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.* 40, 1513–1522. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2019v40n4p1513>

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>

Santos, L.F., Guimaraes, M.F., de Souza, G.O., Silva, I.W.G., Santos, J.R., Azevedo, S.S., Horta, M.C., 2017. Seroepidemiological survey on *Leptospira* spp. infection in wild and domestic mammals in two distinct areas of the semi-arid region of northeastern Brazil. *Trop. Anim. Health Pro.* 49, 1715–1722. <https://doi.org/10.1007/s11250-017-1382-9>

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. <https://doi.org/10.5216/cab.v12i2.4420>

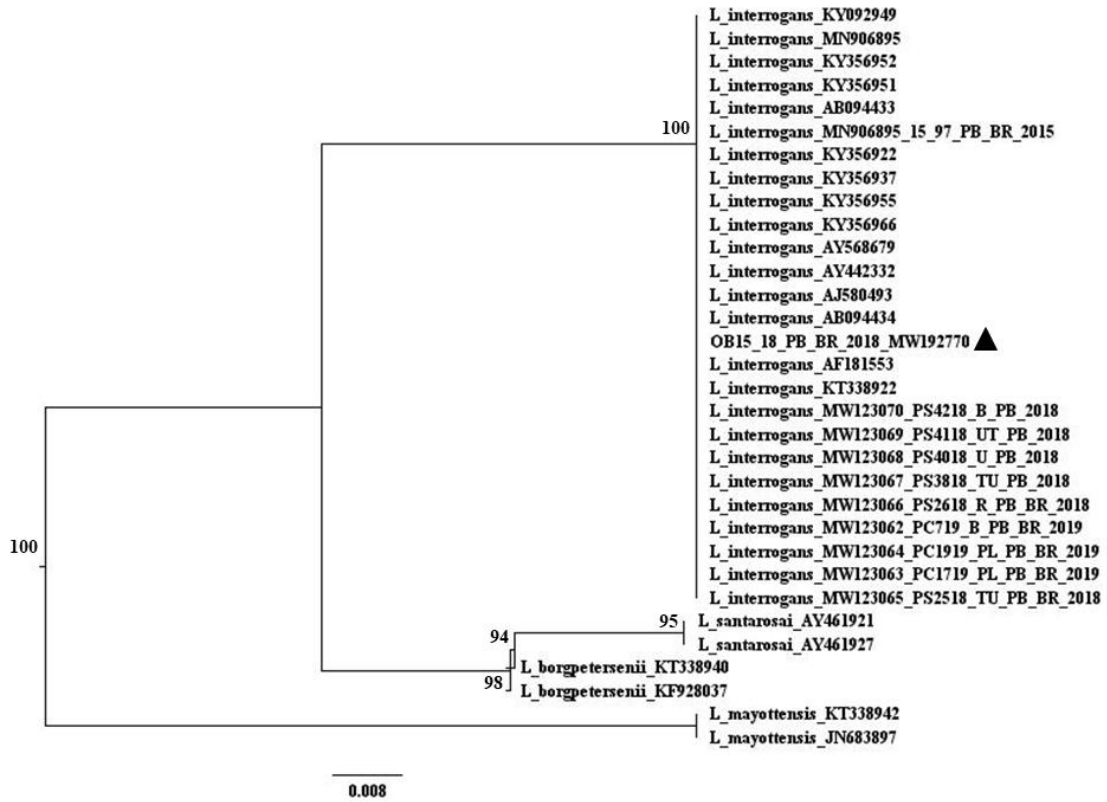
Silva, A.F., Farias, P.J.A., Silva, M.L.C.R., Araújo Júnior, J.P., Malossi, C.D., Ullmann, L.S., Costa, D.F., Higino, S.S.S., Azevedo, S.S., Alves, C.J., 2019. High frequency of genital carriers of *Leptospira* sp. in sheep slaughtered in the semi-arid region of northeastern Brazil. *Trop. Anim. Health Prod.* 51, 43. <https://doi.org/10.1007/s11250-018-1657-9>

Silva, J.M.C., Leal, I.R., 2017. Caatinga, first ed. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-68339-3>

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>

Thibeaux, R., Iraola, G., Ferrés, I., Bierque, E., Girault, D., Soupé-Gilbert, M.E., Goarant, C., 2018. Deciphering the unexplored *Leptospira* diversity from soils uncovers genomic evolution to virulence. *Microb. Genom.* 4, 1-10. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000144>

## Figures/Tables



**Fig. 1.** Phylogenetic tree based on the nucleotide sequence alignment of the LipL32 gene from *Leptospira* sp. constructed on Bio Neighbor-Joining method and Jukes and Cantor model bootstrap with 1,000 repetitions. ▲ Sequenced sample of one ram's bladder.



**Table 1**

*Leptospira* sp. MAT, PCR and bacterial growth results in rams reared in the semiarid region of Brazil according to biological materials.

Animal	MAT		PCR results organs and urine						Bacterial growth/PCR results					
	50	100	Urine	Kidney	Bladder	Vas deferens	Vesicular gland	Epididymis tail	Urine	Kidney	Bladder	Vas deferens	Vesicular gland	Epididymis tail
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+▲	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+▲	-
7	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+▲	+	-	-	-
8	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+▲	+	+▲
9	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
10	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+▲	+
11	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+▲	-	-
12	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+
13	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
14	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+▲	-
16	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+▲	-

17	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+▲	+▲	-
18	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+▲	-	-	-
19	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	Ballum	Ballum	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	Ictero*	Ictero*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	Australis	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-
25	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
26	Pyrogenes	-	+	+	+	+	+	+	+▲	+	+	+	+	+▲
27	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+▲	+▲	+	-	-
28	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+▲	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
30	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+▲
31	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
32	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
33	Pyrogenes	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	-	-	+	+	-	-	-	+	+▲	-	-	-	-	+▲
37	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+▲	+▲	-	-	+▲

38	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

\*Ictero: Icterohaemorrhagia; + = positive result; ▲: culture with PCR positivity

**Table 2**

*Leptospira* sp. PCR and bacterial growth results in rams maintained in semiarid conditions according to tract.

Tract	Total of samples	PCR of organs and urine		Bacterial growth		PCR of cultures	
		N° of positive samples	Frequency (%)	N° of positive samples	Frequency (%)	N° of positive samples	Frequency (%)
Urinary	120	48	40	29	24.1	11	38
Genital	120	45	37.5	30	25	12	40

**Table 3**

Samples that amplified leptospiral DNA and bacterial growth in rams maintained in semiarid conditions.

Sample	N° of animals	PCR of organs and urine		Bacterial growth results		PCR of cultures	
		N° positive samples	Frequency (%)	N° positive samples	Frequency (%)	N° positive samples	Frequency (%)
Urine	40	12	30	7	17.5	3	42.8
Kidney	40	17	42.5	10	25	3	30

Bladder	40	19	47.5	12	30	5	41.6
Vas Deferens	40	15	37.5	12	30	3	25
Vesicular Gland	40	15	37.5	7	17.5	4	57.1
Epididymis Tail	40	15	37.5	11	27.5	5	45.4

**Table 4**

Number of positive and negative animals in the PCR of organs and urine in relation to the titration (MAT).

MAT	Urine		Kidney		Bladder		Vas deferens		Vesicular gland		Epididymis tail		Any material			
	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N		
50	5	35	2	3	2	3	3	2	2	3	2	3	1	4	4	1
100	2	38	0	2	0	2	1	1	1	1	0	2	0	2	1	1

P: positive; N: negative

**Table 5**

MAT sensitivity and specificity in 50 and 100 titers compared to PCR of organ and urine.

Title	Parameter	Urine	Kidney	Bladder	Vas deferens	Vesicular gland	Epididymis tail	Any material
-------	-----------	-------	--------	---------	--------------	-----------------	-----------------	--------------

50	SEN	0.166	0.117	0.157	0.133	0.133	0.066	0.120
	SPE	0.892	0.869	0.904	0.880	0.880	0.840	0.900
100	SEN	0.000	0.000	0.052	0.066	0.000	0.000	0.040
	SPE	0.928	0.913	0.952	0.960	0.920	0.920	0.933

Sen: sensitivity; Spe: specificity

**Table 6**

Number of positive and negative animals in the bacterial growth in relation to the titration (MAT).

MAT	Urine		Kidney		Bladder		Vas deferens		Vesicular gland		Epididymis tail		Any material			
	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N		
50	5	35	2	3	1	4	2	3	1	4	1	4	1	4	2	3
100	2	38	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2

P: positive; N: negative

**Table 7**

MAT sensitivity and specificity in 50 and 100 titers compared to Bacterial Growth.

Title	Parameter	Urine	Kidney	Bladder	Vas deferens	Vesicular gland	Epididymis tail	Any material
50	SEN	0.285	0.1	0.166	0.083	0.142	0.090	0.058

	SPE	0.909	0.866	0.892	0.857	0.878	0.862	0.812
100	SEN	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	SPE	0.939	0.933	0.928	0.928	0.939	0.931	0.913

Sen: sensitivity; Spe: specificit

## **CAPÍTULO II**

Investigação do trato genital como via de transmissão de *Leptospira interrogans* em caprinos machos criados na região semiárida do Brasil

Manuscrito a ser publicado no periódico “Veterinary Microbiology”

(Fator de Impacto: 3.293)

## Investigação do trato genital como via de transmissão de *Leptospira interrogans* em caprinos machos criados na região semiárida do Brasil

Rafael Rodrigues Soares<sup>a</sup>, Nathanael Natércio da Costa Barnabé<sup>a</sup>, João Pessoa Araújo Júnior<sup>b</sup>, Camila Dantas Malossi<sup>b</sup>, Leila Sabrina Ullmann<sup>b</sup>, Diego Figueiredo da Costa<sup>c</sup>, Maria Luana Cristiny Rodrigues Silva<sup>b</sup>, Severino Silvano dos Santos Higino<sup>b</sup>, Sergio Santos de Azevedo<sup>b</sup>, Clebert José Alves<sup>b,\*</sup>

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

<sup>b</sup> Universidade de São Paulo (USP), Av. Prof. Almeida Prado, 1280, São Paulo, SP 05508-900, Brazil

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

<sup>d</sup> Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Centro de Ciências Agrárias (CCA), Rodovia BR 079, Km 02, Areia, PB 58397-000, Brazil

---

\* Corresponding author

E-mail address: clebertja@uol.com.br (C. J. Alves). Phone number: +55 83 99382 1516

---

### Highlights

- 1 *Leptospira* spp. está presente no trato genital de machos caprinos
- 2 No sequenciamento, um ducto defente teve 100% de similaridade pra *L. interrogans*
- 3 Mesmo em ambiente adverso, *Leptospira* spp. consegue se manter
- 4 Trato genital pode ser considerado um sítio extrarrenal deste agente
- 5 Transmissão venérea pode estar contribuindo com a manutenção e transmissão



## Resumo

A *Leptospira* é uma doença presente em diversos ambientes, incluindo aqueles com condições desfavoráveis para a sobrevivência. Para isso, evidências apontam para a sua adaptação ao trato genital. O objetivo do estudo foi detectar *Leptospira* spp. por meio de técnicas sorológicas, moleculares e bacterianas em amostras dos tratos genital e urinário de caprinos machos abatidos sob condição semiárida. Quarenta animais destinados ao abate foram amostrados e, de cada um, colhidas amostras dos tratos urinário e genital, destinados à reação em cadeia da polimerase (PCR) e crescimento bacteriano, bem como amostras de soro para a soroaglutinação microscópica (SAM). Dados sorológicos apontaram três (7.5%) animais positivos para o sorogrupo Pyrogenes. A respeito do teste molecular, 18 (45%) dos 40 animais foram positivos. DNA de *Leptospira* spp. foi encontrado em 25/120 (20.8%) das amostras do trato urinário e em 23/120 (19.1%) do trato urinário, totalizando 48/240 (20%) órgãos positivos, sem diferença estatística significativa. Uma amostra de ducto deferente foi encaminhada para o sequenciamento e mostrou 99% de similaridade com *L. interrogans*. Ao todo, 240 culturas foram avaliadas e, destas, 36 (15%) apresentaram crescimento bacteriano. Deste modo, a leptospirose se faz presente nos animais manejados em um ambiente de condições adversas e sua disseminação pode estar ligada à transmissão venérea.

Palavras chave: Caprino, Pequeno Ruminante, Isolamento, Soroaglutinação Microscópica, Molecular, Trato Geniturinário.

## Introdução

A leptospirose é uma doença causada por uma bactéria do gênero *Leptospira*, família Leptospiraceae, ordem Spirochaetales (Adler, 2014) que gera grandes perdas econômicas e preocupações acerca da saúde pública (Ellis, 2015). A eliminação e manutenção do agente no ambiente é feita pela urina contaminada de diversos hospedeiros, como domésticos, sinantrópicos e selvagens, em virtude da gradativa aproximação dos ecossistemas urbano e silvestre (Costa et al., 2014; Jorge et al., 2012). Animais de companhia e de produção podem se infectar pelo contato direto e indireto com fluidos e órgãos do trato geniturinário e atuar como fonte de infecção para outros animais e para o ser humano (Ajayi et al., 2020; Nogueira et al., 2020). Levantamentos sorológicos mostraram que os caprinos são especialmente sensíveis às infecções pelo sorovares Pomona, Hardjo,

Icterohaemorrhagiae e Grippytyphosa, que podem levar à manifestação de hemoglobinúria, icterícia, abortamento e até mesmo óbito são alguns dos achados (Ajayi et al., 2020; Costa et al., 2016; Ellis, 2014). Por consequência, gera impactos negativos a uma atividade com potencial de crescimento e que serve, em muitos casos, como principal fonte de renda de famílias do Nordeste Brasileiro, especialmente no semiárido (Farias et al., 2019).

Em caprinos a leptospirose se apresenta, em sua maioria, de forma assintomática (Rezaei et al., 2016). Na esfera epidemiológica, esses animais desenvolvem um importante papel por serem fontes de eliminação do agente no rebanho, podendo infectar outros animais e seres humanos (Alves et al., 2017).

Apesar de ser um ambiente que oferece condições adversas para a manutenção e sobrevivência, estudos prévios realizados com pequenos ruminantes no semiárido brasileiro vem demonstrando a presença deste agente (Higino et al., 2013; Costa et al. 2016; Silva et al., 2019; Nogueira et al., 2020), fato este que pode estar relacionado à transmissão direta por via venérea, uma vez que não é influenciada pelas condições ambientais (Ellis, 2014). Estudos voltados para bovinos e ovinos tem apontados sinais clínicos da doença com características próprias para o trato reprodutivo, não sendo, desta forma, consequência de uma bacteremia do trato urinário. Amostras como fluido vaginal, útero, ovário, tuba uterina, cauda do epidídimo, glândula vesicular e ducto deferente apresentaram, por meio do PCR, DNA de *Leptospira* spp., reforçando a importância dos estudos voltados para o trato genital (Silva et al., 2019; Loureiro & Lilenbaum, 2020; Nogueira et al., 2020; Soares et al., 2021). Nessa mesma linha de pesquisa, poucos trabalhos foram feitos para a espécie caprina, sendo avaliados materiais como urina, rim, fluido vaginal e sêmen (Lilenbaum et al., 2007; Lilenbaum et al., 2008; Ajayi et al., 2020), deixando em aberto lacunas sobre quais outros órgãos do trato geniturinário são passíveis de colonização por este agente.

A região Semiárida apresenta características desafiadoras para a sobrevivência e manutenção de diversas formas de vida, inclusive as microscópicas. Apresentou, em 2019, uma média pluviométrica de 315mm (INMET, 2020). Além disso, apresenta alta radiação solar, contribuindo para a redução da disponibilidade de água nos solos (Alves et al., 1996). Estudos prévios vêm demonstrando que, mesmo com essas adversidades, o agente vem se mantendo em ovinos e animais silvestres (Costa et al., 2017; Nogueira et al., 2020; Fernandes et al., 2020). Na espécie caprina, poucos estudos foram realizados (Costa et al., 2016; Higino et al., 2013; Pimenta et al., 2019) e, por não haver nenhum dado sobre a manifestação da doença no trato geniturinário, faz-se necessário um estudo a nível sorológico, molecular e bacteriano para entendimento da dinâmica nessa condição

epidemiológica única. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi detectar *Leptospira* spp. por meio de técnicas sorológicas, moleculares e bacterianas em amostras dos tratos genital e urinário de bodes abatidos sob condição semiárida.

## **Materiais e Métodos**

### Coleta de amostras

As coletas das amostras foram realizadas no Abatedouro Público de Patos (Latitude: 07° 01' 28" S; Longitude: 37° 16' 48" W), localizado na região semiárida do Estado da Paraíba. Para se obter o quantitativo mínimo de amostras a serem coletadas foi utilizada a seguinte fórmula por análise de uma proporção (Arango, 2009):

$$n = \frac{p_0 \times q_0 \times \left( z_{1-\beta} + z_{\alpha/2} \times \sqrt{\frac{p_1 \times q_1}{p_0 \times q_0}} \right)^2}{(p_1 - p_0)}$$

onde,

$n$  = tamanho mínimo amostra

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

$Z_{1-\beta} = 1.64$  (Z valor de força de 95%)

$P_0 = 31.5\%$  (proporção de referência para a positividade no PCR) (Lilenbaum et al., 2009)

$P_1 = 77.4\%$  (estimativa da proporção experimental de positividade para PCR) (Hamond et al., 2014)

$q_0 = 1 - p_0$

$q_1 = 1 - p_1$

De acordo com esses dados seriam necessários 30 animais, entretanto, esse quantitativo foi ajustado para 40. As coletas foram realizadas entre os meses de março e abril de 2019, que

corresponde ao período chuvoso, cuja temperatura média, de acordo com o Instituto Nacional de Meteorologia (INMET, 2020), foi de 27.5°C. Todos os animais trabalhados eram oriundos do semiárido Paraibano, conforme dados obtidos pela Guia de Trânsito Animal.

Fragments de rim, bexiga, glândula vesicular, cauda do epidídimo e ducto deferente foram coletadas e imediatamente processadas em ambiente com bico de Bunsen, placas de Pétri e materiais cirúrgicos autoclavados. Foram fragmentados em porções de 2g, transferidos para microtubos de polietileno livre de DNA e RNA e armazenados a -20°C. Urina foi coletada por meio da punção na bexiga, utilizando seringa estéril de 5mL, armazenada em microtubos livres de DNA e RNA, com adição de 0,5mL de solução salina fosfatada. Todos os materiais foram destinados ao isolamento bacteriano e diagnóstico molecular.

Amostras de sangue foram obtidas durante a sangria dos animais, usando tubos estéreis devidamente identificados, contendo ativador de coágulo e capacidade para 8mL. Ao chegar no Laboratório de Doenças Transmissíveis – UFCG, foram centrifugadas a 1,512g durante 10 minutos e o soro foi transferido para microtubos de polietileno e armazenados a -20°C.

#### Teste sorológico

O diagnóstico sorológico da leptospirose foi realizado por meio da SAM, conforme protocolo proposto (OIE, 2018). Foram utilizados uma coleção viva de 24 sorovares de 18 sorogrupos: Australis, Autumnalis, Ballum, Canicola, Celledoni, Cynopteri, Djasiman, Grippytyphosa, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Lousiana, Mini, Panama, Pomona, Pyrogenis, Sejroe e Tarassovi. Essa bateria, originária do Instituto Pasteur (França), foi adquirida junto ao Laboratório de Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal Fluminense (UFF). Foram testados no ponto de corte 1:50, seguindo protocolo que mostrou maior sensibilidade na detecção de anticorpos anti-*Leptospira* em caprinos (Costa et al., 2016), e consideradas como positivas amostras com aglutinação em mais de 50% do campo de visão.

#### Isolamento bacteriano

Amostras de rim, bexiga, glândula vesicular, cauda do epidídimo, ducto deferente e 100µL de urina foram imediatamente inoculadas em tubos contendo 5mL de meio EMJH semi-sólido (Difco, BD Franklin Lakes, NJ,USA) enriquecido com amphotericin B (0.05 mg/mL), 5-fluorouracil (1mg/mL), fosfomicin (4 mg/mL), trimethoprim (0.2 mg/mL) and sulfamethoxazole (0.4 mg/mL) (Costa et al., 2017). Os tubos foram armazenados em estufa BOD a 28°C durante 24h. Após este período, foram repicadas em novo meio EMJH semi-sólido sem antibióticos e examinadas semanalmente durante 12 semanas.

#### Diagnóstico molecular de tecidos, urina e culturas

A extração de DNA das amostras e do controle positivo de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni Fiocruz L1130 foi realizada com o kit Dneasy sangue e tecido (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante. Na PCR foram utilizados dois iniciadores LipL32-45F (5'-AAG CAT TAC CGC TTG TGG TG-3 ') e Lip L32-286R (5'-GAA CTC CCA TTT CAG CGA TT-3') para amplificar o gene LipL32, desenvolvido por Stoddard et al. (2009), que tem como alvo o gene LipL32, específico para leptospiros patogênicas. Foi utilizada a metodologia descrita por Hamond et al. (2014).

#### Sequenciamento e análise filogenética

As reações de sequenciamento foram realizadas usando os primers LipL32-45F e LipL32-286R (Stoddard et al., 2009) com o kit de sequenciamento Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Para a eletroforese capilar, foi utilizado um analisador de genes 3130xL e o polímero POP-7 (Platt et al., 2007). O alinhamento da sequência foi realizado com BioEdit (HALL, 1999), enquanto as sequências do conjunto de dados foram obtidas do GenBank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, EUA) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), usando a Ferramenta BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). A análise filogenética foi gerada no software Seaview4 (Gouy et al., 2010), em que sua árvore foi construída usando o bootstrap do modo Neighbor-Joining

com 1.000 repetições. Isso foi visualizado por meio do FigTree v1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>). A reconstrução filogenética incluiu sequências de leptospiros para comparação.

### Análise estatística

Foram utilizados o teste Qui-quadrado com correção de continuidade de Yates e Exato de Fischer para comparar as proporções de animais / amostras positivas na PCR e Cultura do trato genital e urinário, com nível de significância de 5%, por meio do software BioEstat 5.3.

### Resultados

Dos 40 animais avaliados, foram detectados anticorpos anti-Leptospira em três (7.5%) para o sorogrupo Pyrogenes (Tabela 1).

A respeito do diagnóstico molecular, 18 (45%) dos 40 animais foram positivos na PCR. Destes, três tiveram resultados positivos apenas para o trato urinário, quatro foram positivos apenas para o trato genital e 11 para ambos os tratamentos. Os dados de crescimento bacteriano mostram que 19/40 (47.5%) animais foram positivos no crescimento da leptospira, com cinco animais apresentando amostra positiva apenas para o trato urinário, quatro para o genital e nove para ambos (Tabela 1).

No total, 240 amostras de órgãos e urina de 40 animais foram testadas. O DNA de *Leptospira* spp. foi encontrado 25/120 (20.8%) amostras do trato urinário e em 23/120 (19.1%) do trato urinário, totalizando 48 órgãos (Tabela 2), sem diferença estatística significativa entre as proporções ( $p = 0.7469$ ). As frequências por material biológico foram as seguintes: bexiga 12 (30%), glândula vesicular 10 (25%), ducto deferente 9 (22.5%), urina 8 (20%), rim 5 (12.5%) e cauda do epidídimo 4 (10%) (Tabela 3). Ao comparar os resultados da PCR entre órgãos e urina, verificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa.

Crescimento bacteriano foi observado em 36/240 (15%) culturas, sendo 18/120 (15%) para o urinário e 18/120 (15%) para o trato genital (Tabela 2), sem diferença estatística significativa entre as proporções ( $p = 0$ ). A ordem ascendente dos órgãos / fluidos com maior frequência foram: rim dois (5%), cauda do epidídimo quatro (10%), glândula vesicular seis (15%), urina sete (17.5%), ducto

deferente oito (20%) e bexiga nove (22.5%) (Tabela 3). A comparação das proporções de crescimento bacteriano entre os materiais biológicos não mostrou diferença estatisticamente significativa.

Foi realizado PCR destas 36 amostras que apresentaram crescimento bacteriano, onde 27 (75%) tiveram confirmação do DNA de *Leptospira* sp. Destas, 12 (44.4%) foram do trato urinário, sendo seis bexigas (66.6%), cinco urinas (71.4%) e um rim (50%). Para o trato genital, o quantitativo foi de 15 (55.6%), com sete ductos deferente (87.5%), quatro caudas dos epidídimos (100%) e quatro glândulas vesiculares (66.6%) (Tabela 3).

O sequenciamento direto dos produtos do PCR foi possível em um animal, sendo uma amostra de Ducto Deferente. Nessa amostra, foi constatada 99% de similaridade a *L. interrogans* em BLAST no Genbank (Figura 1).

## **Discussão**

O presente estudo mostrou uma baixa frequência de animais com anticorpos anti-*Leptospira* e para um único sorogrupo, Pyrogenes. De acordo com a classificação climática de Köppen-Geiger, a região de estudo apresenta o clima BSh (Francisco et al., 2015), refletindo em altas temperaturas e baixa pluviosidade. Essa condição pode estar relacionada com o comprometimento da transmissão indireta do agente pelo ambiente pois, conforme Adler & Moctezuma (2010), o ambiente ideal para crescimento do agente é temperatura média 29°C e presença de áreas com água. Além disso, o fator racial influencia de forma direta na susceptibilidade pois, animais sem padrão racial definido, apresentam menor risco de infecção quando comparados aos animais de linhagem pura (Costa et al., 2016). No presente estudo foram trabalhados apenas animais sem padrão racial definido e que, devido à rusticidade apresentada pela espécie caprina, pode ter contribuído para os achados.

O sorovar Pyrogenes está relacionado com a presença de animais silvestres, pois estes são reservatórios, podendo contribuir para a infecção e disseminação do agente entre rebanhos (Pasquali et al., 2017). Em adição, o papel dos roedores não pode ser negligenciado, pois estes se instalam próximo a povoações humanas, beneficiando-se das condições ecológicas criadas pela atividade humana, podendo levar a doença para animais de produção, bem como seres humanos (Vihol et al., 2017). O semiárido, por apresentar baixa pluviosidade, não possui muitas ofertas de alimentos, sendo necessário a suplementação com ração comercial que são guardadas em armazéns, podendo atrair roedores (Higino et al., 2013).

Neste estudo, as evidências moleculares detectadas via PCR confirmaram a presença de *Leptospiras* na urina e em órgãos do trato geniturinário, sem diferença estatística entre estes. Os resultados obtidos para a presença de DNA de leptospira no trato geniturinário de bodes criados na região semiárida revelam uma situação que aponta para um quadro de animais portadores de leptospirose em fase de leptospirúria, isso porque a frequência encontrada foi bem superior quando comparado ao sorológico. Nesse estágio, o animal não apresenta resposta humoral satisfatória, devido à fuga do agente para os rins, onde serão eliminados pela urina, podendo contribuir para a colonização da bexiga (Higino & Azevedo, 2014).

A frequência de PCR – positivo das amostras do trato urinário foi maior quando comparada com as amostras do trato genital e, embora não tenha tido diferença estatística significativa, o sistema reprodutivo deve ser considerado como um sítio extrarrenal de infecção e potencial fator de disseminação da doença nos rebanhos. Pode-se propor que a infecção genital em caprinos machos deve ser tratada como uma infecção primária, e não unicamente associada com a síndrome renal/sistêmica, conforme observado em modelo bovino (Loureiro & Lilenbaum, 2020) e ovino (Nogueira et al., 2020; Soares et al., 2021). Essa situação traz à tona a viabilidade da infecção intraespécie de forma venérea (Lilenbaum et al., 2008).

A leptospirose era uma doença cujo foco de estudo era direcionado para o trato urinário, contudo, fatores como: resposta imune vaginal, infecção experimental uterina, possibilidade da transmissão horizontal, predileção de alguns sorogrupos (Sejroe) pelo trato genital, infecção uterina crônica (Loureiro & Lilenbaum, 2020) e detecção molecular do agente em órgãos que compõem esse trato (Hammond et al., 2014; Silva et al., 2019; Nogueira et al., 2020b; Soares et al., 2021) trouxeram à tona o papel do trato genital para o ciclo de infecção deste agente em modelos bovinos e ovinos. Foi observado no PCR de órgãos e urina que quatro animais apresentaram amostras positivas apenas para o trato genital, enquanto que para o urinário foram três. Em relação ao crescimento bacteriano, fragmentos dos órgãos de quatro animais foram exclusivos para o genital e cinco para o urinário. Esses dados acompanham a linha de pensamento adotada pelos autores supracitados, onde a síndrome genital não é mais uma consequência da bacteremia do trato urinário, podendo ser igualmente importante para a espécie caprina, até então pouco estudada.

A sorologia tem se mostrado uma importante ferramenta no diagnóstico da doença no rebanho (Lilenbaum et al., 2009), entretanto, o controle da leptospirose depende também da detecção de animais que eliminam o agente no ambiente. Devida à diferença de resultados frente ao diagnóstico molecular, a sorologia se mostra insuficiente para identificar carreadores de forma individual. Embora



laborioso (Picardeau, 2013), o PCR se mostrou como uma importante alternativa no diagnóstico em razão da alta sensibilidade e especificidade e, apesar do custo relativamente alto, paga-se quando identifica e trata de forma correta um animal carreador, reduzindo as taxas de transmissão e manutenção da doença no rebanho. O uso combinado de técnicas sorológica e molecular se mostra capaz de detectar caprinos carreadores (Lilenbaum et al., 2009). Desta forma, os diagnósticos indiretos e diretos tornam-se importantes ferramentas para que programas de controle sanitário obtenham êxito (Hamond et al., 2014).

O processo de isolamento tende a ser difícil e laborioso, podendo apresentar entraves como crescimento fastidioso, contaminação e baixa sensibilidade (Lilenbaum et al., 2009), embora que, no nosso estudo, as frequências do PCR e Isolamento, a nível animal, foram próximas, com 45 e 42,5%, respectivamente. Essa técnica é um passo importante quando se busca decifrar o perfil taxonômico do agente, de modo a entender o potencial dos sorovares circulantes em regiões negligenciadas onde a doença não é reconhecida e não é rotineiramente diagnosticada, seja em animais domésticos, seja em seres humanos (Mgode et al., 2015). A próxima etapa é a identificação adicional desses isolados em uma ampla gama de espécies terrestres para fins sorodiagnósticos e epidemiológicos, permitindo assim o melhor mapeamento do padrão de distribuição de sorovares e a carga real desta doença em toda região (Mgode et al., 2015). Para melhor monitoramento, foi realizado PCR das culturas dos 40 animais, onde 14 (35%) tiveram pelo menos um resultado positivo, dados estes importantes quando almeja o isolamento e, posteriormente, o sequenciamento completo.

Uma amostra PCR positiva do Ducto Deferente foi sequenciada, confirmando que esta pertence ao gênero *Leptospira*. Outras amostras devem ser sequenciadas pois, de acordo com Silva et al. (2020), a análise dos sequenciamentos gera uma inferência filogenética mais precisa e também permite uma compreensão mais abrangente dos aspectos relacionais à adaptação do sorovar a determinado hospedeiro.

## **Conclusão**

De acordo com os resultados obtidos, foi possível detectar a presença do sorogrupo Pyrogenes. Uma amostra sequenciada do ducto deferente mostrou 99% de similaridade com *L. interrogans*. Além disso, os órgãos e urinas amostrados apresentaram pelo menos um resultado positivo, tanto no

molecular quanto no isolamento, mostrando que a leptospirose pode estar sendo disseminada pela via venérea.

## **Financiamento**

Esse trabalho recebeu recursos do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

## **Declaração de concorrência de interesses**

Os autores afirmam que não têm interesses conflitantes.

## **Aprovação ética**

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) sob o número 17/2019.

## **Reconhecimentos**

Agradecemos aos trabalhadores do Matadouro Municipal de Patos que nos ajudaram a recolher as amostras, bem como os outros colegas, que tornaram possível, este estudo.

## **Referências**

Adler, B., 2015. History of Leptospirosis and Leptospira, in: Adler, B. (Ed.), *Leptospira and Leptospirosis*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 1–9. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_1)

Adler, B., Moctezuma, A.P., 2010. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet. Microbiol.* 140, 287–296. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.012>

Ajayi, O.L., Antia, E.R., Esther, O.O., Oladipo, T.M., Olaniyi, O.M., Awoyomi, O.J., 2020. Detection of Pathogenic *Leptospira* spp. in Goats from Slaughterhouses in Southwestern Nigeria Using Isolation, Histochemistry and Immunohistochemistry. **Mac. Vet. Ver.** 44, 1-12. <http://dx.doi.org/10.2478/macvetrev-2020-0031>.

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.* 63, 11–19.

Alves, J.R.A., Lima, G.M.S., Silva, J.D., Costa, D.F., Santos, F.A., Higino, S.S.S., Azevedo, S.S., Alves, C.J., 2017. Epidemiological characterization and risk factors associated with leptospirosis and brucellosis in small ruminants sold at animal fair in the Sertão Region of Pernambuco State, a semiarid Region of Northeastern Brazil. **Semina: Ciênc. Agrár.** 38, 1933-1945. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2017v38n4p1933>.

Arango, H.G., 2009. Bioestatística teórica e computacional. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

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. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n2p819>.

Costa, D.F., Silva, A.F., Brasil, A.W.L., Loureiro, A.P.P., Santos, F.A., Azevedo, S.S., Lilenbaum, W., Alves, C.J., 2017. Leptospirosis in native mexed-breed sheep slaughtered a semiarid region of Brazil. *Cienc. Rural.* 47, 1–6. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20160563>

Costa, F., Porter, F.H., Rodrigues, G., Farias, H., Faria, M.T., Wunder, E.A., Osikowicz, L.M., Kosoy, M.Y., Reis, M.G., Ko, A.I., Childs, J.E., 2014. Infections by *Leptospira interrogans*, Seoul Virus, and *Bartonella* spp. Among Norway Rats (*Rattus norvegicus*) from the Urban Slum Environment in Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 14, 33-40. <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2013.1378>.

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

Farias, A.E.M., Alves, J.R.A., Alves, F.S.F., Pinheiro, R.R., Faccioli-Martins, P.Y., Lima, A.M.C., Azevedo, S.S., Alves, C.J., 2019. Characterization of goat production systems in five states of

northeastern brazil. *Semina: Ciênc. Agrár.* 40, 3691-3708. *Pesq. Vet. Bras.* 38, 1344–1350. DOI: 10.5433/1679-0359.2019v40n6Supl3p3691

Fernandes, J.J., Pinheiro, T.J., Costa, D.F., Júnior, J.P.A., Malossi, C.D., Ullmann, L.S., Silva, M.L.C.R., Azevedo, S.S., Alves, C.J., Higino, S.S.S., 2020. *Leptospira interrogans* infection in tegu lizard (*Tupinambis merianae*), Brazil. **Ciênc. Rural.** 50, 1-4. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20200424>.

Francisco, P.R., Medeiros, R.M., Santos, D., Matos, R.M., 2015. Classificação Climática de Köppen e Thornthwaite para o Estado da Paraíba. **Ver. Bras. Geogr. Fís.** 8, 1006-1016.

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.

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 an accurate diagnosis of leptospirosis in livestock. *Vet. Res. Commun.* 38, 81-85. <http://dx.doi.org/10.1007/s11259-013-9582-x>.

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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.09.005>.

INMET [internet]. Instituto Nacional de Meteorologia. Estação Meteorológica de Observação de Superfície Automática. [cited 2020 jan 07]. Available from: <https://clima.inmet.gov.br/progt>

Jorge, S., Hartleben, C.P., Seixas, F.K., Coimbra, M.A.A., Stark, C.B., Larrondo, A.G., Amaral, M.G., Albano, A.P.N., Minello, L.F., Dellagostin, O.A., Brod, C.S., 2012. *Leptospira borgpetersenii* from free-living white-eared opossum (*Didelphis albiventris*): first isolation in brazil. **Acta Trop.** 124, 147-151. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.07.009>.

Lilenbaum, W., Vargas, R., Brandão, F.Z., Cortez, A., Souza, S.O., Brandão, P.E., 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., Vargas, 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. *Vet. Sci. Res. J.* 87, 16-19. <http://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>

Martins, G., Lilenbaum, W., 2013. The panorama of animal leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil, regarding the seroepidemiology of the infection in tropical regions. **Bmc Vet. Res.** 9, 1-7. <http://dx.doi.org/10.1186/1746-6148-9-237>.

Martins, G., Penna, B., Hamond, C., Leite, R., C.-K., Silva, A., Ferreira, A., Brandão, F., Oliveira, F., Lilenbaum, W., 2011. Leptospirosis as the most frequent infectious disease impairing productivity in small ruminants in Rio de Janeiro, Brazil. *Trop. Anim. Health. Prod.* 44, 773-777. <http://dx.doi.org/10.1007/s11250-011-9964-4>.

Mgode, G.F., Machang'u, R.S., Mhamphi, G.G., Katakweba, A., Mulungu, L.S., Durnez, L., Leirs, H., Hartskeerl, R.A., Belmain, S.R., 2015. *Leptospira* Serovars for Diagnosis of Leptospirosis in Humans and Animals in Africa: common leptospira isolates and reservoir hosts. *PLOS Negl. Trop. Dis.* 9, 1-19. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0004251>.

OIE, 2018. Leptospirosis, in: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. World Organization for Animal Health, Paris, pp. 503-516.

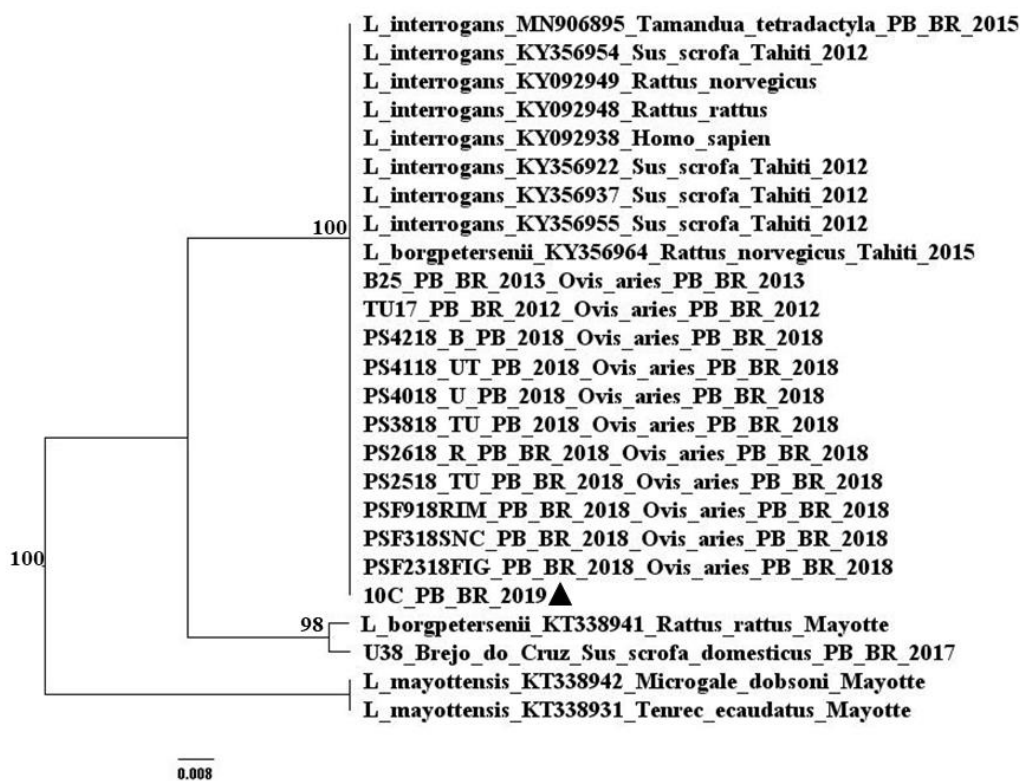
Nogueira, D.B., Costa, F.T.R., Bezerra, C.S., Silva, M.L.C.R., Costa, D.F., Viana, M.P., Silva, J.D., Araújo Júnior, J.P., Malossi, C.D., Ullmann, L.S., Santos, C.S.A.B., Alves, C.J., Azevedo, S.S., 2020. Use of serological and molecular techniques for detection of *Leptospira* sp. carrier sheep under semiarid conditions and the importance of genital transmission route. **Acta Trop.** 207, 1-25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105497>

Picardeau, M., 2013. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Med. Mal. Infect.* 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., Higinio, 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.* 40, 1513–1522. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2019v40n4p1513>

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>

- 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., 2019. 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, J.C.R., Marvulo, M.F.V., Ferreira, F., Dias, R.A., Ferreira Neto, J.S., Heinemann, M.B., Andrade Filho, G.V., Souza, G.O., Lima Filho, C.D.F., Magalhães, F.J.R., Lilenbaum, W., Dellagostin, O.A., de Oliveira, N.R., Jorge, S., Kremer, F.S., Santos, C.M., Esteves, S.B., Miotto, B.A., 2020. Seroepidemiological investigation of animal leptospirosis and molecular characterization of the first *Leptospira* strain isolated from Fernando de Noronha archipelago, Brazil. *Transbound. Emerg. Dis.* 0, 1-12. <http://dx.doi.org/10.1111/tbed.13915>.
- Soares, R.R., Barnabé, N.N.C., Nogueira, D.B., Silva, L.S.C., Júnior, J.P.A., Malossi, C.D., Ullmann, L.S., Costa, D.F., Silva, M.L.C.R., Higino, S.S.S., Azevedo, S.S., Alves, C.J., 2021. Serological, molecular and bacteriological approaches for detecting *Leptospira* sp. carrier rams maintained in semiarid conditions. *Acta Trop.* 213, 1-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105759>.
- 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>
- Vihol, P.D., Patel, J.M., Patel, J.H., Prasad, M.C., Dabas, V.S., Kalyani, I.H., Tyagi, K.K., 2017. Seroepidemiology of Caprine Leptospirosis in South Gujarat Region of India. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 6, 1599-1608. <http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2017.603.184>.



**Fig. 1.** Árvore filogenética baseada no alinhamento da sequência nucleotídica do gene LipL32 da *Leptospira* sp. construída no modelo de associação de Neighbor com 1.000 repetições. ▲ Amostra do Ducto Deferente sequenciada.

**Tabela 1**

Resultados de SAM, PCR e crescimento bacteriano de *Leptospira* spp. em caprinos machos criados na região semiárida do Brasil segundo materiais biológicos.

Identificação Animal	SAM		PCR Órgãos e Fluido						Crescimento Bacteriano/PCR results					
	50	100	Urina	Rim	Bexiga	Ducto Deferente	Glândula Vesicular	Cauda do Epidídimo	Urina	Rim	Bexiga	Ducto Deferente	Glândula Vesicular	Cauda do Epidídimo
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+•	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+•	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+•	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+•	-	-	-	-
16	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-



17	-	-	+	-	+	+	+	-	+•	-	+	+•	-	-
18	-	-	+	-	+	+	-	-	+•	-	-	+•	-	-
19	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
29	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+•	-	+•	-
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+•	+•
32	*Pyr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+•	-	-	-
33	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-
34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	-	*Pyr	+	+	+	+	+	-	+•	-	-	+•	-	-
36	*Pyr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+•	-	+•	+•

38	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+•	+•	-	+•
39	-	-	+	+	+	+	+	-	+•	-	+•	-	+•	-
40	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+•	+•	-	+•
Total	2	1	8	5	12	9	10	4	7	2	9	8	6	4

\*Pyr: Pyrogenes; + = resultado positivo; •: culture com PCR positivo

### Tabela 2

Resultados da PCR e do crescimento bacteriano de *Leptospira* spp. em caprinos machos mantidos em condições semiáridas de acordo com o trato.

Trato	Nº de animais	PCR de órgãos e urina		Crescimento bacteriano		PCR de culturas	
		Nº amostras positivas	Frequência (%)	Nº amostras positivas	Frequência (%)	Nº amostras positivas	Frequência (%)
Urinário	120	25	20.8	18	15	12	66.7
Genital	120	23	19.1	18	15	15	100

### Tabela 3

Amostras que amplificaram o DNA de leptospira e o crescimento bacteriano em caprinos machos mantidos em condições semiáridas.

Amostra	PCR de órgãos e urina	Crescimento bacteriano	PCR de culturas
---------	-----------------------	------------------------	-----------------

	Nº de animais	Nº amostras positivas	Frequência (%)	Nº amostras positivas	Frequência (%)	Nº amostras positivas	Frequência (%)
Urina	40	8	20	7	12.5	5	71.4
Rim	40	5	12.5	2	5	1	50
Bexiga	40	12	30	9	15	6	66.6
Ducto Deferente	40	9	22.5	8	17.5	7	87.5
Glândula Vesicular	40	10	25	6	15	4	66.6
Cauda do Epidídimo	40	4	10	4	10	4	100

### **CAPÍTULO III**

Colonização genital em cabras carreadoras de *Leptospira* spp. mantidas em condição semiárida

Manuscritos a ser publicado no periódico “Acta Tropica”  
(Fator de Impacto: 3.112)

**Transmissão genital de cabras carreadoras de *Leptospira* spp. mantidas em  
condição semiárida**

Rafael Rodrigues Soares<sup>a</sup>, Nathanael Natércio da Costa Barnabé<sup>a</sup>, João Pessoa Araújo Júnior<sup>b</sup>, Camila Dantas Malossi<sup>b</sup>, Leila Sabrina Ullmann<sup>b</sup>, Diego Figueiredo da Costa<sup>c</sup>, Maria Luana Cristiny Rodrigues Silva<sup>b</sup>, Severino Silvano dos Santos Higino<sup>b</sup>, Sergio Santos de Azevedo<sup>b</sup>, Clebert José Alves<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> *Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR), Av. Universitária, s/n, Santa Cecília, Patos, PB 58708-110, Brazil*

<sup>b</sup> *Universidade de São Paulo (USP), Av. Prof. Almeida Prado, 1280, São Paulo, SP 05508-900, Brazil*

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

<sup>d</sup> *Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Centro de Ciências Agrárias (CCA), Rodovia BR 079, Km 02, Areia, PB 58397-000, Brazil*

---

\* Corresponding author

*E-mail address:* clebertja@uol.com.br (C. J. Alves)

## Resumo

Estudos relacionados a prevalência da leptospirose na região semiárida mostraram que mesmo durante longos períodos de seca, a doença tem notável frequência nos rebanhos da região. Trata-se de uma doença negligenciada e não se conhece a extensão de seus efeitos no semiárido brasileiro. A dinâmica deste agente é bem estudada no trato urinário, todavia, não se tem muitos estudos a respeito do trato genital em fêmeas caprinas. Observando este cenário, o presente trabalho teve como objetivo diagnosticar *Leptospira* spp. em cabras mantidas no semiárido brasileiro por meio de técnicas sorológica, molecular e isolamento. Foram coletadas amostras de sangue, fluido vaginal, urina e fragmentos de órgãos do trato geniturinário de 40 cabras destinadas ao abate. Foi utilizado a Soroaglutinação Microscópica (SAM) como técnica sorológica, com uma bateria de 24 sorovares. Foi executada a Reação da Cadeia em Polimerase (PCR) do fluido vaginal, urina e dos fragmentos de órgãos, bem como o isolamento bacteriano destes mesmos produtos em meio seletivo. As amostras do isolamento que apresentaram morfologia foram submetidas ao PCR. Foi observado que dois (5%) animais foram positivos na sorologia para o sorogrupo Pyrogenes, no ponto de corte 1:50 (50%). Total de 29 (72.5%) animais foram positivos no PCR, com presença do DNA em 51/160 (31.8%) amostras do trato genital e 34/120 (28,3%) do trato urinário, sem diferença estatística. Para o crescimento bacteriano, 22/40 (55%) animais foram positivas no crescimento, sendo observado morfologia em 19/160 (11,8%) para o trato genital e 16/120 (13.3%) para o urinário, sem diferença estatística. Duas amostras de útero mostraram 99% de similaridade com *L. interrogans* após o sequenciamento. Os dados mostram que para ter um diagnóstico preciso é necessário a utilização de duas técnicas. Deste modo, as cabras mantidas sob condição semiárida foram positivas para *Leptospira*, com amostras positivas tanto do trato urinário quanto do genital, sendo esta a forma alternativa de adaptação e manutenção do agente para condições severas e adversas.

Palavras-chaves: Leptospirose caprina, PCR, Trato genital, Transmissão venérea, Isolamento

## 1. Introdução

O Nordeste Brasileiro, possui diversos climas, dentre eles o semiárido. Este clima possui particularidades únicas, como altas temperaturas e aridez, impactando a fisiologia dos animal mantidos nestas características tão únicas e sendo desafio para a manutenção de sobrevivência de microrganismos. Contudo, foi demonstrado a presença da leptospirose no semiárido, evidenciando uma possível adaptação da doença a ambientes mais hostis, mesmo sendo uma doença associada a maior umidade e precipitação (Viana et al., 2021; 2022). Foi observado, no estado da Paraíba, alto índice da infecção, que pode ser explicado pela maior densidade animal por rebanho (Silva et al., 2021a).

A região Semiárida apresenta características desafiadoras para a sobrevivência e manutenção de diversas formas de vida, inclusive as microscópicas. Apresenta uma média pluviométrica anual de 500mm, com períodos apresentando menos de 300mm (INMET, 2019). Além disso, apresenta alta radiação solar que leva a alta taxa de evaporação, contribuindo para a redução da disponibilidade de água nos solos e diminuição do pH (Alves et al., 1996).

A leptospirose é uma doença causada por uma bactéria do gênero *Leptospira*, família *Leptospiraceae*, ordem *Spirochaetales* (Faine et al., 1999). A eliminação e manutenção do agente no ambiente é feita pelo contato com fluidos e órgãos do trato geniturinário, podendo atuar como fonte de infecção para outros animais e para o ser humano. Levantamentos sorológicos mostraram que os caprinos são acometidos pelos sorovares Pomona, Hardjo, Icterohaemorrhagiae e Grippytyphosa, que podem levar à manifestação de hemoglobinúria, icterícia, abortamento e até mesmo óbito são alguns dos achados (Alves et al., 2012; Ellis, 2015). Medidas de controle e prevenção, como a utilização de testes sorológicos adequados e redução do ponto de corte para 1:50, vacinação e assistência técnica precisam ser tomadas para reduzir a prevalência da doença (Silva et al., 2021b).

Publicações sobre a presença de leptospiros no trato genital de ovinos evidenciou a importância deste como sítio extraurinário na epidemiologia da infecção (Nogueira et al., 2020; Soares et al., 20021), bem como evidenciando a presença deste agente em pequenos ruminantes do semiárido brasileiro (Silva et al., 2019; Nogueira et al., 2020), fato este que pode estar relacionado à transmissão direta por via venérea, uma vez que não depende e não é influenciada pelas condições ambientais (Ellis, 2015). Em bovinos,

os sinais clínicos apontam como uma doença que também acomete o trato reprodutivo com características próprias, e não somente como consequência de uma bacteremia da infecção renal (Loureiro & Lilenbaum, 2020). Amostras como fluido vaginal, útero, ovário, tuba uterina, cauda do epidídimo, glândula vesicular e ducto deferente apresentaram, por meio do PCR, DNA de *Leptospira* spp., reforçando a importância dos estudos voltados para o trato genital (Silva et al., 2019; Nogueira et al., 2020; Soares et al., 2021), principalmente para a espécie caprina, onde poucos estudos foram efetuados.

Em caprinos a leptospirose se apresenta, em sua maioria, de forma assintomática (Sabri et al., 2019). Na esfera epidemiológica, esses animais desenvolvem um importante papel pois garante a permanência de fontes de infecção e eliminação do agente no rebanho, podendo infectar outros animais e seres humanos. A associação com técnicas diretas e definitivas do agente em diferentes órgãos e fluidos do trato genital e urinário torna o diagnóstico mais concreto e confiável, reduzindo as taxas de falso-negativo (Silva et al., 2018; Nogueira et al., 2020).

Estudos prévios vêm demonstrando que, mesmo com as adversidades do clima semiárido, o agente vem se mantendo em ovinos e animais silvestres (Costa et al., 2017; Nogueira et al., 2020; Fernandes et al., 2020). Na espécie caprina, poucos estudos foram realizados (Araujo Neto et al., 2010; Viana et al., 2022) e, por não haver nenhum dado sobre a manifestação da doença no trato geniturinário, se faz necessário um estudo a nível sorológico, molecular e bacteriano para entendimento da dinâmica nessa condição epidemiológica única. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi verificar a capacidade da *Leptospira* spp. em colonizar órgãos e fluidos dos tratos genital e urinário de cabras carreadoras mantidas sob condição semiárida

## **2. Materiais e Métodos**

### *2.1. Coleta de amostras*

O trabalho foi desenvolvido no Abatedouro Público de Patos (Latitude: 07° 01' 28" S; Longitude: 37° 16' 48" W), região semiárida do Estado da Paraíba. O quantitativo mínimo de amostras a serem coletadas foi obtido por meio da seguinte fórmula por análise de uma proporção (Arango, 2009):



$$n = \frac{p_0 \times q_0 \times \left( z_{1-\beta} + z_{\alpha/2} \times \sqrt{\frac{p_1 \times q_1}{p_0 \times q_0}} \right)^2}{(p_1 - p_0)}$$

onde,

$n$  = tamanho mínimo da amostra

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

$Z_{1-\beta} = 1.64$  (Z valor para o poder de 95%)

$P_0 = 32.4\%$  (proporção de referência de positividade de PCR) (Hamond et al., 2013)

$P_1 = 75\%$  (estimativa da proporção experimental de positividade para PCR) (Soares et al., 2021)

$q_0 = 1 - p_0$

$q_1 = 1 - p_1$

De acordo com esses dados seriam necessários 30 animais, entretanto, foram selecionados 40 animais entre os meses de Maio e Junho de 2019, que corresponde ao período chuvoso. A temperatura média para esse período, de acordo com o Instituto Nacional de Meteorologia (INMET, 2019), foi de 27.5°C. De acordo com dados obtidos pela Guia de Trânsito Animal, os animais eram oriundos do semiárido Paraibano.

Fragmentos de rim, bexiga, ovário, útero e tuba uterina foram coletados e imediatamente processados em ambiente com bico de Bunsen, placas de Pétri e materiais cirúrgicos autoclavados. Foram divididos em porções de 2g, transferidos para microtubos de polietileno livre de DNA e RNA e armazenados a -20°C. Fluido vaginal foi coletado com swab estéril diretamente da região cérvico-vaginal e urina foi coletada por meio da punção na bexiga, utilizando seringa estéril de 5mL, ambos foram armazenados em microtubos livres de DNA e RNA, com adição de 0,5mL de solução salina fosfatada. Todos os materiais foram destinados ao isolamento bacteriano e diagnóstico molecular.

Amostras de sangue foram obtidas durante a sangria dos animais, usando tubos estéreis devidamente identificados, contendo ativador de coágulo e capacidade para 8mL. Ao chegar no Laboratório de Doenças Transmissíveis – UFCG, foram centrifugadas a 1,512g durante 10 minutos e o soro foi transferido para microtubos de polietileno e armazenados a -20°C.

## 2.2. Teste sorológico

Os anticorpos anti-*Leptospira* foram detectados por meio da SAM, conforme protocolo proposto (OIE, 2018). Foram utilizados 24 sorovares de 18 sorogrupos (Australis, Autumnalis, Ballum, Canicola, Celledoni, Cynopteri, Djasiman, Grippotyphosa, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Lousiana, Mini, Panama, Pomona, Pyrogenis, Sejroe e Tarassovi), originárias do Instituto Pasteur, França, e adquiridas junto ao Laboratório de Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal Fluminense (UFF). Foram consideradas como positivas amostras com aglutinação em mais de 50% do campo de visão e então titulada na razão de dois. Foi utilizado o ponto de corte 1:50, seguindo protocolo que mostrou maior sensibilidade na detecção de anticorpos anti-*Leptospira* em ovinos (Soares et al., 2021).

## 2.3. Isolamento bacteriano

Após a coleta, amostras de rim, bexiga, ovário, útero, tuba uterina, swab com fluido vaginal e 100µL de urina foram inoculados em tubos contendo 5mL de meio EMJH semi-sólido (Difco, BD Franklin Lakes, NJ,USA) enriquecido com amphotericin B (0.05 mg/mL), 5-fluorouracil (0.1mg/mL), fosfomicin (0.4 mg/mL), trimethoprim (0.2 mg/mL) and sulfamethoxazole (0.4 mg/mL) (Costa et al., 2017). Os tubos foram estocados em estufa BOD a 28°C durante 24hs. Após este período, foram repicadas em novo meio EMJH semi-sólido sem antibióticos e incubadas novamente na estufa BOD. As culturas foram examinadas semanalmente durante 12 semanas em microscopia de campo escuro.

## 2.4. Diagnóstico molecular

A extração de DNA de tecidos, fluido vaginal, urina e culturas foi realizada com o kit Dneasy sangue e tecido (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante. Na PCR foram utilizados os iniciadores LipL32-45F (5'-AAG CAT TAC CGC TTG TGG TG-3 ') e Lip L32-286R (5'-GAA CTC CCA TTT CAG CGA TT-3') para amplificar o gene LipL32, desenvolvido por Stoddard et al. (2009), que tem como alvo o gene LipL32, específico para leptospiros patogênicas. Foi utilizada a metodologia descrita por Hamond et al. (2014). Como controle positivo, foi utilizado DNA extraído

da cepa *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni Fiocruz L1130 e água ultrapura como controle negativo.

### 2.5. Sequenciamento e análise filogenética

As reações de sequenciamento foram realizadas usando os primers LipL32-45F e LipL32-286R (Stoddard et al., 2009) com o kit de sequenciamento Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Para a eletroforese capilar, foi utilizado um analisador de genes 3130xL e o polímero POP-7 (Platt et al., 2007). O alinhamento da sequência foi realizado com BioEdit (Hall, 1999), enquanto as sequências do conjunto de dados foram obtidas do GenBank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, EUA) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), usando a ferramenta BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). A análise filogenética foi gerada no software Seaview4 (Gouy et al., 2010), em que sua árvore foi construída usando o bootstrap do modo Neighbor-Joining com 1.000 repetições. Isso foi visualizado por meio do FigTree v1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>). A reconstrução filogenética incluiu sequências de leptospiros para comparação.

### 2.6. Análise estatística

O teste Qui-quadrado com correção de continuidade de Yates e Exato de Fischer foram utilizados para comparar as proporções de animais / amostras positivas na PCR e Cultura do trato genital e urinário, com nível de significância de 5%, por meio do software BioEstat 5.3.

## 3. Resultados

Dos 40 animais avaliados, foram detectados anticorpos anti-*Leptospira* em dois (5%) para o sorogrupo Pyrogenes, no ponto de corte 1:50 (Tabela 1).

O diagnóstico molecular mostrou que 29 (72.5%) dos 40 animais foram positivos. Destes, dois tiveram resultados positivos apenas para o trato urinário, quatro foram positivos apenas para o trato genital e 23 para ambos os tratos. Os dados de crescimento bacteriano mostram que 22/40 (55%) animais foram positivos no crescimento da

leptospira, com seis animais apresentando amostra positiva apenas para o trato urinário, sete para o genital e nove para ambos (Tabela 1).

No total, 280 amostras de órgãos e fluidos de 40 animais foram testadas. O DNA de *Leptospira* spp. foi encontrado 51/160 (31.8%) amostras do trato genital e em 34/120 (28.3%) do trato urinário, totalizando 85 órgãos (Tabela 2), sem diferença estatística significativa entre as proporções ( $p = 0.5236$ ). As frequências por material biológico foram as seguintes: bexiga 21 (52.5%), ovário 17 (42.5%), tuba uterina 14 (35%), útero 10 (25%), fluido vaginal 10 (25%), rim 9 (22.5%) e urina 4 (10%) (Tabela 3). Ao comparar os resultados da PCR entre órgãos e fluidos, verificou-se que houve diferença estatisticamente significativa entre urina e bexiga ( $p < 0.0001$ ).

Crescimento bacteriano foi observado em 35/280 (12.5%) culturas, sendo 19/160 (11.8%) para o trato genital e 16/120 (13.3%) para o urinário (Tabela 2), sem diferença estatística significativa entre as proporções ( $p = 0.7150$ ). A ordem ascendente dos órgãos / fluidos com maior frequência foram: ovário 9 (22.5%), bexiga 8 (20%), rim 7 (17.5%), fluido vaginal 5 (12.5%), útero 4 (10%), tuba uterina 1 (2.5%) e urina 1 (2.5%) (Tabela 3). A comparação das proporções de crescimento bacteriano entre os materiais biológicos não mostrou diferença estatisticamente significativa.

Todas as culturas com crescimento bacteriano foram testadas no PCR, sendo 9 (25.7%) foram positivas para o teste (Tabela 1). Destas, 4/16 (25%) foram do trato urinário e 5/19 (26.3%) do trato genital (Tabela 2). A ordem por número absoluto foi: rim 3 (42.8%), útero 2 (50%), fluido vaginal 2 (40%), tuba uterina 1 (100%) e bexiga 1 (12.5%) (Tabela 3).

O sequenciamento direto dos produtos do PCR foi possível em dois animais diferentes, sendo duas amostras de útero. Nessas amostras, foram constatadas 99% de similaridade a *L. interrogans* em BLAST no Genbank (Figura 1).

#### **4. Discussão**

A região semiárida, cujo bioma é a caatinga, apresenta altas temperaturas. Essa condição é adversa para a manutenção do agente, refletindo em uma baixa frequência de animais com anticorpos circulantes, fato este observado nos resultados deste trabalho ao detectar apenas um sorogrupo. O sorogrupo reativo foi o Pyrogenes, que está ligado à contaminação ambiental e tem como hospedeiros os animais silvestres, com destaque para

os roedores, que podem ter sido a fonte de infecção de cabras mantidas no semiárido (Vihol et al., 2017; Pimenta et al., 2019). Além disso, estudos mostram que pode acontecer reação cruzada com outros sorogrupos, como o *Icterohaemorrhagiae* (Pinto et al., 2017).

Os resultados obtidos para a presença de DNA *Leptospiral* no trato geniturinário de cabras criadas na região semiárida revelaram um quadro crônico de animais portadores de leptospirose. Isso, porque a frequência encontrada, foi bem superior quando comparado ao sorológico. Nesse estágio, o animal não apresenta resposta humoral satisfatória, devido à fuga do agente para os rins, onde serão eliminados pela urina, podendo contribuir para a colonização da bexiga (Oruene & Bekwele, 2020).

O PCR mostrou que a frequência de amostras positivas do trato genital foi maior que a do trato urinário. Essa diferença demonstra que a transmissão sexual é uma via alternativa para as leptospirosas se manterem nas cabras portadoras e que estão adaptadas ao trato genital. Não houve diferença estatística significativa entre as proporções, indicando que ambos os tratos possuem igual importância aos portadores. Essa alta frequência do trato genital, com destaque para ovário e tuba uterina, evidenciam o sistema reprodutivo como um sítio extrarrenal de infecção em cabras e potencial fator de manutenção e disseminação da doença nos rebanhos.

Em ovinos, estudos experimentais e convencionais mostraram que os problemas reprodutivos em consequência da leptospirose estão sendo elucidados e correlacionam a presença do agente no trato genital como uma infecção própria, e não mais consequência da renal (Costa et al., 2018; Nogueira et al., 2020; Soares et al., 2021). O mesmo também pode ser observado no modelo bovino (Loureiro & Lilenbaum, 2020). Ao comparar os resultados entre fluidos e órgãos, constatou-se que apenas dois animais tiveram todas as amostras positivas e nenhum teve todas as amostras positivas para um só trato, mesmo com a proximidade anatômica. Esses dados reforçam a hipótese de que a infecção genital em cabras deve ser tratada como uma infecção primária, e não mais associada com a síndrome renal/sistêmica.

A alta frequência de cabras com órgãos do trato geniturinário positivos revela um problema de saúde pública pois os magarefes, tratadores e demais trabalhadores agrícolas estão em contato contínuo com animais de produção, na sua maioria sem os equipamentos de proteção individual (EPI) corretos (Cranford et al., 2021). Faz-se necessário implementação de programas sanitários, como a Rede Global de Ação Ambiental da

Leptospirose (GLEAN), que utiliza da abordagem One Health para reduzir impactos que a leptospirose causa nas comunidades, com estratégias relacionadas a fatores ambientais, biológicos, ecológicos, econômicos e demográficos (Dubey et al., 2021), envolvendo profissionais da saúde como médicos, enfermeiros, agentes de saúde e médicos veterinários (Silva et al., 2020).

A sorologia é uma importante ferramenta no diagnóstico da doença quando se trabalha com rebanhos. Entretanto, ela se mostra insuficiente para identificar carreadores de forma individual (Nogueira et al., 2020), conforme observado a diferença de resultados frente ao diagnóstico molecular. O PCR é uma técnica mais rápida, fácil e menos trabalhosa, se apresentando como uma importante alternativa no diagnóstico em razão da alta sensibilidade e especificidade e, apesar do custo relativamente alto, se justifica o seu emprego quando identifica e trata de forma correta um animal carreador, reduzindo as taxas de transmissão e manutenção da doença no rebanho (Di Azevedo & Lilenbaum, 2020). A discrepância entre as frequências pode estar relacionada ao mecanismo de fuga do agente, onde migra da corrente sanguínea para os órgãos onde a imunidade celular não penetra, a exemplo dos rins.

O isolamento bacteriano teve taxa considerável de amostras positivas, com frequências parecidas para ambos os tratos. Além disso, algumas destas tiveram confirmação molecular da presença do código genético da bactéria. Esses dados são importantes, pois através destes, dar-se-á os passos seguintes para a construção do banco de antígenos autóctones, que contribuirão para a detecção de um número maior de animais positivos (Sarmiento et al., 2012). Com o uso do sequenciamento foi possível identificar, em duas amostras de útero, infecção por cepas patogênicas de *L. interrogans*.

Na região semiárida, o grande desafio é obter um diagnóstico rápido e confiável, bem como estratégias de controle que envolva criadores e técnicos. Os dados obtidos neste e em outros trabalhos mostram que a associação entre a SAM e o PCR mostrou ser bastante eficiente, aumentando consideravelmente a sensibilidade e especificidade.

Em conclusão, os resultados obtidos indicam que as fêmeas caprinas estão adaptadas à *Leptospira* sp., se mantendo por vias alternativas como órgãos e fluidos do trato genital e disseminando de forma venérea.

## **Aprovação ética**

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) sob o número 17/2019.

## **Declaração de contribuição de autoria de crédito**

**Rafael Rodrigues Soares:** Conceituação, redação - rascunho original, redação - revisão e edição. **Nathanael Natércio da Costa Barnabé:** Conceituação, investigação, escrita - rascunho original. **Denise Batista Nogueira:** Conceituação, investigação, escrita - rascunho original. **Lais Samara Cavalcante da Silva:** Conceituação, investigação. **Diego Figueiredo da Costa:** Conceituação, investigação. **Maria Luana Cristiny Rodrigues Silva:** Conceituação, investigação, escrita - rascunho original. **João Pessoa Araújo Júnior:** Investigação. **Camila Dantas Malossi:** Investigação. **Leila Sabrina Ullmann:** Investigação. **Severino Silvano dos Santos Higino:** Redação - rascunho original, redação - revisão e edição. **Sérgio Santos de Azevedo:** Conceituação, redação - rascunho original, redação - revisão e edição. **Clebert José Alves:** Conceituação, supervisão, aquisição de financiamento, redação - rascunho original, redação - revisão e edição.

## **Declaração de Concorrência de Interesses**

Os autores afirmam que não têm interesses conflitantes.

## **Agradecimentos**

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro a este estudo.

## **Referências**

Adler, B., Moctezuma, A.P., 2010. Leptospira and leptospirosis. Vet. Microbiol. 140, 287–296. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.012>

Allan, K.J., Maze, M.J., Galloway, R.L., Rubach, M.P., Biggs, H.M., Halliday, Jo E. B., Cleaveland, S., Saganda, W., Lwezuala, B.F., Kazwala, R.R., Mmbaga, B.T., Maro, V.P., Crump, J.A., 2020. Molecular Detection and Typing of Pathogenic *Leptospira* in Febrile Patients and Phylogenetic Comparison with *Leptospira* Detected among Animals in Tanzania. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 103, 1427-1434. doi:10.4269/ajtmh.19-0703

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>

Arango, H.G., 2009. Bioestatística teórica e computacional, third ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro

Araújo Neto, J.O., Alves, C.J., Azevedo, S.S., Silva, M.L.C.R., Batista, C.S.A., 2010. Soroprevalência da leptospirose em caprinos da microrregião do Seridó Oriental, Estado do Rio Grande do Norte, Brasil, e pesquisa de fatores de risco. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 47, 150-155.

Costa, D.F., Silva, A.F., Brasil, A.W.L., Loureiro, A.P.P., Santos, F.A., Azevedo, S.S., Lilenbaum, W., Alves, C.J., 2017. Leptospirosis in native mixed-breed sheep slaughtered a semiarid region of Brazil. *Cienc. Rural.* 47, 1–6. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20160563>

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., 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>

Cranford, H.M., Taylor, M., Browne, A.S., Alt, D.P., Anderson, T., Hamond, C., Hornsby, R.L., LeCount, K., Schlater, L., Stuber, T., De Wilde, L., Burke-France, V.J., Ellis, E.M., Nally, J.E., Bradford, B., 2021. Exposure and Carriage of Pathogenic



Leptospira in Livestock in St. Croix, U.S. Virgin Islands. *Trop. Med. Int. Health.* 85, 1-10. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed6020085>

Di Azevedo, M.I.N., Lilenbaum, W., 2020. An overview on the molecular diagnosis of animal leptospirosis. *Lett. Appl. Microbiol.* 72, 496—508. doi:10.1111/lam.13442

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

Faine, S., Adler, B., Bolin, C. and Perolat, P. (1999) *Leptospira and Leptospirosis*. 2nd Edition, Medisci Press, Melbourne.

Farias, A.M., Alves, J.R.A., Alves, F.S.F., Pinheiro, R.R., Faccioli-Martins, P.Y., Lima, A.M.C., Azevedo, S.S., Alves, C.J., 2019. Characterization of goat production systems in five states of northeastern Brazil. *Semina: Ciênc. Agrár.* 40, 3691-3708. *Pesq. Vet. Bras.* 38, 1344–1350. DOI: 10.5433/1679-0359.2019v40n6Supl3p3691

Fernandes, J.J., Pinheiro, T.J., Costa, D.F., Araújo Júnior, J.P., Malossi, C.D., Ullmann, L.S., Silva, M.L.C.R., Azevedo, S.S., Alves, C.J., Higino, S.S.S., 2020. *Cienc. Rural.* 50, 1-4. Doi: 10.1590/0103-8478cr20200424.

Francisco, P.R.M., Medeiros, R.M., Santos, D., Matos, R.M., 2015. Classificação Climática de Köppen e Thornthwaite para o Estado da Paraíba. *Rev. Bras. Geogr.* 8, 1006-1016.

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

Hamond, C., Martins, G., Bremont, S., Medeiros, M.A., Bourhy, P., Lilenbaum, W., 2014. Predominance of *Leptospira interrogans* serovar Bratislava DNA in vaginal fluid of mares suggests sexual transmission of leptospirosis. *Anim. Reprod. Sci.* 151, 275–279. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.10.019>

INMET [internet]. Instituto Nacional de Meteorologia. Estação Meteorológica de Observação de Superfície Automática. [cited 2021 sep 10]. Available from: <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=estacoes/estacoesAutomaticas>

Lilenbaum, W., Varges, R., Brandão, F.Z., Cortez, A., Souza, S.O., Brandão, P.E., 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>

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>

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)

Nogueira, D.B., Costa, F.T.R., Bezerra, C.S., Silva, M.L.C.R., Costa, D.F., Viana, M.P., Silva, J.D., Araújo Júnior, J.P., Malossi, C.D., Ullmann, L.S., Santos, C.S.A.B., Alves, C.J., Azevedo, S.S., 2020. Use of serological and molecular techniques for detection of

Leptospira sp. carrier sheep under semiarid conditions and the importance of genital transmission route. *Acta Trop.* 207, 1-25.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105497>

OIE, 2014. Leptospirosis. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*

Oruene, I.S., Bekwele, B.B., 2020. Incidence Of Leptospirosis In Household Goats In Some Villages In Rivers State. *Int. J. Innov. Res. Adv. Stud.* 7, 1-4.

Otaka, D.Y., Martins, G., Hamond, C., Penna, B., Medeiros, M.A., Lilenbaum, W., 2012. Serology and PCR for bovine leptospirosis: a herd and individual approaches. *Vet. Rec.* 170, 1-2. <https://doi.org/10.1136/vr.100490>

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.* 40, 1513–1522.  
<http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2019v40n4p1513>

Pinto, P.S., Libonati, H., Lilenbaum, W., 2017. A systematic review of leptospirosis on dogs, pigs, and horses in Latin America. *Trop Anim Health Prod.* 49, 231–238. DOI: 10.1007/s11250-016-1201-8

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>

Sabri, A.R., Khairani-Bejo, S., Zunita, Z. and Hassan, L., 2019. Molecular detection of *Leptospira* sp. in cattle and goats in Kelantan, Malaysia after a massive flood using multiplex polymerase chain reaction. *Trop. Biomed.* 36, 165–171.

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., 2019. High frequency of genital carriers of *Leptospira* sp. in sheep slaughtered in the semi-arid region of northeastern Brazil. *Trop. Anim. Health Prod.* 51, 43-47. <https://doi.org/10.1007/s11250-018-1657-9>

Silva, J.D., Viana, M.P., Calado, L.G.L.P., Lima, A.M.C., Alves, F.S.F., Pinheiro, R.R., Costa, D.F., Silva, G.C.P., Azevedo, S.S., Alves, C.J., 2021. Spatial Distribution of Serologically Reactive Sheep to *Leptospira* spp. in the Northeast Region of Brazil. *Acta Sci. Vet.* 49, 1-9. DOI: 10.22456/1679-9216.117519.

Sarmento, A.M.C., Azevedo, S.S., Morais, Z.M., Souza, G.O., Oliveira, F.C.S., Gonçalves A.P., Miraglia F., Vasconcellos S.A., 2012. Emprego de estirpes *Leptospira* spp. isoladas no Brasil na microtécnica de soroglutinação microscópica aplicada ao diagnóstico da leptospirose em rebanhos bovinos de oito estados brasileiros. *Pesq. Vet. Bras.* 7, 601-606.

Soares, R.R., Barnabé, N.N.C., Nogueira, D.B, Silva, L.S.C., Araújo Júnior J.P., Malossi, C.D., Ullmann, L.S., Costa, D.F., Silva, M.L.C.R., Higino, S.S.S., Azevedo, S.S., Alves, C.J., 2021. Serological, molecular and bacteriological approaches for detecting *Leptospira* sp. carrier rams maintained in semiarid conditions. *Acta Trop.* 213, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105759>

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>

Viana, M.P., Silva, J.D., Lima, A.M.C., Alves, F.S.F., Pinheiro, R.R., Calado, L.G.L.P., Costa, D.F., Higino, S.S.S., Azevedo, S.S., Alves, C.J., 2021. Epidemiological survey for goat leptospirosis in two distinct biomes in Northeastern Brazil. *Res., Soc. Dev.* 10, 1-12. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i2.12242>

Viana, M.P., Silva, J.D., Lima, A.M.C., Alves, F.S.F., Pinheiro, R.R., Costa, D.F., Silva, G.C.P., Calado, L.G.L.P., Azevedo, S.S., Alves, C.J., 2022. Epidemiological and geospatial characterization of goat leptospirosis in Northeast region of Brazil. *Small Rumin. Res.* 206. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2021.106589>

Vihol, P.D., Patel, J.M., Patel, J.H., Raval, J.K., Kalyani, J.H., Varia, R.D., 2017. Serological Investigation on Leptospirosis in Clinically Ailing Goats. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* 6, 845-850. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.604.105>

Figuras / Tabelas

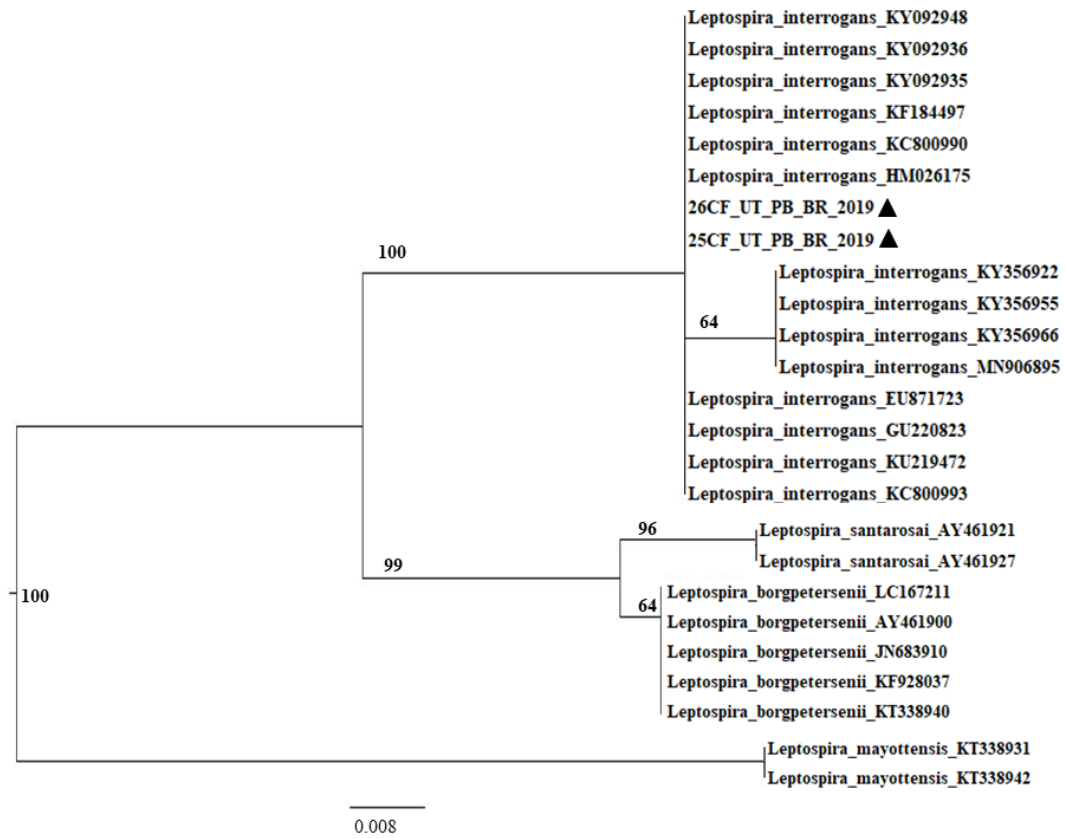


Figura 1. Árvore filogenética baseada no alinhamento da sequência nucleotídica do gene LipL32 da *Leptospira* spp. construída no modelo de associação de Neighbor com 1.000 repetições. ▲ Amostras sequenciadas.

**Tabela 1**

Resultados de SAM, PCR e crescimento bacteriano de *Leptospira* spp. em cabras criadas na região semiárida do Brasil de acordo com materiais biológicos.

Identificação Animal	SAM	PCR Órgãos e Fluido							Crescimento Bacteriano						
	50	Urina	Rim	Bexiga	Fluido Vaginal	Útero	Ovário	Tuba Uterina	Urina	Rim	Bexiga	Fluido Vaginal	Útero	Ovário	Tuba Uterina
1	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+ <sup>^</sup>	+ <sup>^</sup>	-	-	-
2	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
5	Pyr*	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
6	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-
7	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+ <sup>^</sup>	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
21	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
22	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
23	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
25	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
26	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
29	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	Pyr*	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
32	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
33	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
34	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
35	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-
36	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-
37	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-



38	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-
39	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+ <sup>^</sup>	-	+	-	-	-
40	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-
Total	2	4	9	21	10	10	17	14	1	7	8	5	4	9	1

\*Pyr: Pyrogenes; + = resultado positive; <sup>^</sup>cultura com positividade de PCR

### Tabela 2

PCR e resultados de crescimento bacteriano para *Leptospira* spp. em cabras mantidas em condições semiáridas de acordo com o trato.

AMOSTRA	Nº total	Órgãos			Culturas		PCR de Culturas	
		Nº de animais positivos	Frequência (%)	Sequenciamento	Nº de amostras positivas	Frequência (%)	Nº de amostras positivas	Frequência (%)
Trato Urinário	120	34	28.3	-	16	13.3	4	25
Trato Genital	160	51	31.8	2	19	15.8	5	26.3

### Table 3

Amostras que amplificaram o DNA de leptospira e o crescimento bacteriano em cabras mantidas em condições semiáridas.

AMOSTRA	Nº total	Órgãos	Culturas	PCR de Culturas
---------	----------	--------	----------	-----------------

		Nº de animais positivos	Frequência (%)	Sequenciamento	Nº de amostras positivas	Frequência (%)	Nº de amostras positivas	Frequência (%)
Urina	40	4	10	-	1	2.5	0	-
Rim	40	9	22.5	-	7	17.5	3	42.8
Bexiga	40	21	52.5	-	8	20	1	12.5
Fluido Vaginal	40	10	25	-	5	12.5	2	40
Útero	40	10	25	2	4	10	2	50
Ovário	40	17	42.5	-	9	22.5	0	-
Tuba Uterina	40	14	35	-	1	2.5	1	100

## **CONCLUSÃO GERAL**

Em virtude dos resultados obtidos na presente tese, pode-se concluir que:

A *Leptospira* spp. está adaptada às condições adversas do clima semiárido, sendo sua presença detectada nas técnicas sorológicas, moleculares e isolamento.

Todas as espécies animais trabalhadas apresentaram aumento na sensibilidade quando utilizado o ponto de corte 50, sugerindo o emprego deste protocolo para futuros testes com amostras provenientes do semiárido.

Os dados moleculares e de isolamento bacteriano evidenciam a importância do trato genital como sítio extrarrenal e com características próprias, não sendo consequência da infecção do trato urinário. Além disso, sua disseminação pode estar ligada à transmissão venérea.