

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**PERFORMANCE DO EXAME ANDROLÓGICO, SÊMEN PLASMA
AGLUTINAÇÃO MODIFICADA, SOROAGLUTINAÇÃO
MICROSCÓPICA, PCR E SEQUENCIAMENTO NO
DIAGNÓSTICO DA LEPTOSPIROSE NO SÊMEN E SORO DE
TOUROS BOVINOS**

SÉRGIO RICARDO MAIOLINO

Botucatu, SP
Novembro, 2019

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**PERFORMANCE DO EXAME ANDROLÓGICO, SÊMEN PLASMA
AGLUTINAÇÃO MODIFICADA, SOROAGLUTINAÇÃO
MICROSCÓPICA, PCR E SEQUENCIAMENTO NO
DIAGNÓSTICO DA LEPTOSPIROSE NO SÊMEN E SORO DE
TOUROS BOVINOS**

SÉRGIO RICARDO MAIOLINO

Tese apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação
em Medicina Veterinária
para obtenção do título de Doutor

Orientador: Prof. Associado Márcio Garcia Ribeiro

Botucatu, SP
Novembro, 2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Maiolino, Sérgio Ricardo.

Performance do exame andrológico, sêmen plasma
aglutinação modificada, soroaglutinação microscópica, PCR e
sequenciamento no diagnóstico da leptospirose no sêmen e soro
de touros bovinos / Sérgio Ricardo Maiolino. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio
de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia

Orientador: Márcio Garcia Ribeiro

Capes: 50502050

1. Diagnóstico molecular. 2. Estudos soropidemiológicos.
3. Leptospirose. 4. Sêmen. 5. Reação em cadeia da polimerase.

Palavras-chave: Diagnóstico molecular; Leptospirose bovina;
Soroprevalência; Viabilidade do sêmen.

Nome do autor: Sérgio Ricardo Maiolino

Data da Defesa: 22 de novembro de 2019

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Associado Márcio Garcia Ribeiro

Presidente e Orientador

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP – Botucatu/SP

Prof. Associado Antônio Carlos Paes

Membro Titular

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP – Botucatu/SP

Prof. Titular Hélio Langoni

Membro Titular

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP – Botucatu/SP

Prof. Dr. Geraldo de Nardi Júnior

Curso de Tecnologia em Agronegócio. Faculdade de Tecnologia - FATEC,
Botucatu, SP

Pós-doutor Gustavo Henrique Batista Lara

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública. FMVZ-UNESP/Botucatu,
SP. Autônomo

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha esposa, Glauceia Suman Maiolino e a meu filho Francisco Suman Maiolino, responsáveis por me darem a grande oportunidade de ser pai.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, aos meus pais, Francisco e Sonia Maiolino pela minha existência e a oportunidade de me manifestar;

Aos meus amigos, que estão por aqui ou já se foram, pelo apoio que sempre recebi;

Ao Prof. Associado Márcio Garcia Ribeiro por todo tempo e paciência dedicados na orientação desse trabalho;

A todos que colaboraram com a execução e condução do estudo.

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

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1. Espécies, sorovares, sorogrupos e cepas representativas de leptospiras utilizadas no teste de soroaglutinação microscópica com antígenos vivos. Laboratório de Zoonoses-FMVZ-UNESP/Botucatu, SP. 2017-2019.	29

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Prevalência da leptospirose em vacas e principais sorovares diagnosticados pela técnica de soroaglutinação microscópica com antígenos vivos em rebanhos das cinco regiões do Brasil. 2017-2019.	15
Tabela 2. Exame andrológico, sêmen plasma aglutinação (SPA) modificada, soroaglutinação microscópica com antígenos vivos (SAM), reação em cadeia pela polimerase (PCR) e sequenciamento, no diagnóstico da leptospirose no sêmen e soro de 203 touros em atividade reprodutiva em monta natural. Região centro-oeste do estado de São Paulo, 2017-2019.	34
Tabela 3. Frequência de touros reagentes a diferentes sorovares de leptospiras diagnosticados pela técnica de soroaglutinação microscópica com antígenos vivos. Região centro-oeste do estado de São Paulo, 2017-2019.	35
Tabela 4. Frequência de touros com títulos sorológicos ≥ 400 no teste de soroaglutinação microscópica com antígenos vivos, segundo o sorovar de leptospira e viabilidade do sêmen no exame andrológico. Região centro-oeste do estado de São Paulo, 2017-2019.	36
Tabela 5. Médias geométricas dos títulos sorológicos e animais sororreagentes no teste de soroaglutinação microscópica com antígenos vivos, segundo diferentes sorovares em 127 touros aptos no exame andrológico. Região centro-oeste do estado de São Paulo, 2017-2019.	37
Tabela 6. Médias geométricas dos títulos sorológicos e animais sororreagentes no teste de soroaglutinação microscópica com antígenos vivos, segundo sorovar testado em touros inaptos no exame andrológico. Região centro-oeste do estado de São Paulo, 2017-2019.	37

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

°C = graus Celsius

μL = microlitro

μm = micrômetro

CCPS = Centro de coleta e processamento de sêmen

DNA = Ácido desoxirribonucleico

e.g. = *exempli gratia* (por exemplo)

ELISA = *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

EMJH = Ellinghausen, MacCullaugh, Johson e Harris

GO = Goiás

Ig = Imunoglobulina

IgA = Imunoglobulina da classe A

IgG = Imunoglobulina da classe G

IgM = Imunoglobulina da classe M

LPS = Lipopolissacarídeos

min = minutos

mL = mililitro

mM = milimolar

NR = não reagente

OIE = World Organisation for Animal Health

PCR = Reação em cadeia pela polimerase

pH = potencial hidrogeniônico

PI = Pós-infecção

rpm = rotações por minuto

rRNA = ácido ribonucleico ribossômico

SAM = Soroaglutinação microscópica com antígenos vivos

seg = segundos

SP = São Paulo

SST = solução salina saturada

USA = United States of America

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	p.1
2. <i>Leptospira</i> spp.: TAXONOMIA E PROPRIEDADES GERAIS	p.4
3. LEPTOSPIROSE BOVINA	p.7
3.1 Epidemiologia	p.7
3.2 Aspectos da patogenia e imunidade	p.8
3.3 Clínica	p.10
3.4 Diagnóstico	p.12
3.4.1 Cultivo microbiológico	p.12
3.4.2 Microscopia de campo escuro	p.12
3.4.3 Soroaglutinação microscópica com antígenos vivos	p.13
3.4.4 Outros testes sorológicos	p.15
3.4.5 Diagnóstico molecular	p.16
3.4.6 Achados de necropsia e histopatológicos	p.16
3.4.7 Diagnóstico diferencial	p.16
3.4.8 Sêmen plasma aglutinação	p.17
3.5 Tratamento e controle	p.17
3.6 Reflexos em Saúde Pública	p.19
4. LEPTOSPIROSE EM TOUROS	p.22
5. OBJETIVOS	p.26
5.1 Geral	p.26
5.2 Específicos	p.26
6. MATERIAL E MÉTODOS	p.27
6.1 Comissão de Ética	p.27
6.2 Animais e criatórios	p.27
6.3 Colheita e estoque das amostras de soro sanguíneo e sêmen	p.27
6.4 Exame andrológico	p.27
6.5 Soroaglutinação microscópica com antígenos vivos	p.28
6.6 Sêmen plasma aglutinação modificada	p.29
6.7 Diagnóstico molecular	p.30
6.7.1 Extração do material genético	p.30
6.7.2 Reações de PCR	p.30
6.7.3 Sequenciamento	p.31

7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	p.32
8. RESULTADOS	p.33
8.1 Exame andrológico	p.33
8.2 Sêmen plasma aglutinação modificada	p.33
8.3 Soroaglutinação microscópica com antígenos vivos	p.33
8.4 Diagnóstico molecular	p.38
9. DISCUSSÃO	p.39
10. CONCLUSÕES	p.45
11. REFERÊNCIAS	p.46

MAIOLINO, S.R. **Performance do exame andrológico, sêmen plasma aglutinação modificada, soroaglutinação microscópica, PCR e sequenciamento no diagnóstico da leptospirose no sêmen e soro de touros bovinos.** Botucatu, 2019. 67p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, SP.

RESUMO

A leptospirose permanece como uma das zoonoses mais prevalentes de origem bacteriana em todo o mundo, particularmente em países de clima tropical. Devido às características peculiares das leptospirosas, a doença é negligenciada ou subdiagnosticada em animais de produção. A maioria dos estudos com bovinos têm focado a doença apenas em vacas. Neste cenário, em virtude dos riscos de infecção do trato reprodutivo de touros e da eliminação do patógeno pelo sêmen, o presente estudo investigou a soroaglutinação microscópica (SAM) com antígenos vivos em 203 touros bovinos adultos em idade reprodutiva, em regime de monta natural, sem sinais aparentes de orquite ou inflamação de glândulas acessórias. Simultaneamente, o sêmen dos touros foi submetido ao exame andrológico e a reação em cadeia pela polimerase (PCR) convencional utilizando o gene *16S rRNA*. Resultados positivos na PCR convencional foram confirmados por sequenciamento. A sêmen plasma aglutinação (SPA) modificada foi realizada substituindo o soro sanguíneo pelo plasma seminal no teste da SAM. O ejaculado de oito (8/203=3,9%) touros foi considerado inapto à reprodução (necropermia e azoospermia). Não foram identificadas aglutininas anti-*Leptospira* na SPA. Foi observada alta frequência (132/203=65%) de títulos na SAM, particularmente para sorovares do sorogrupo Sejroe, e.g., Hardjo CTG (100/203=49,3%), Wolffi (74/203=36,4%), Guaricura (72/203=35,5%) e Hardjoprajitno (56/203=27,6%). O sêmen de três (3/203=1,5%) touros foram positivos na PCR (*16S rRNA*), embora estes animais foram negativos na confirmação por PCR com os genes *Lep1* e *Lep2* e sequenciamento. A alta frequência de sorovares do sorogrupo Sejroe - adaptados a espécie bovina - indica a necessidade de realização de diagnóstico periódico e adoção de medidas de controle e profilaxia contra a leptospirose bovina, particularmente

para evitar a transmissão entre os bovinos, os prejuízos econômicos caracterizados por distúrbios da esfera reprodutiva, bem como devido à preocupação em saúde pública. Na literatura consultada, o exame andrológico, a investigação de aglutininas anti-*Leptospira* no sêmen na SPA, e a confirmação de reações positivas na PCR convencional de sêmen utilizando o sequenciamento foram pesquisados, pela primeira vez, no diagnóstico da leptospirose em touros bovinos.

Key-words: leptospirose bovina, soroprevalência, diagnostico molecular, viabilidade do sêmen.

MAIOLINO, S.R. **Performance of semen viability, modified semen plasma agglutination, microscopic agglutination tests, PCR, and sequencing in the diagnosis of leptospirosis in semen and serum of bovine bulls.** Botucatu, 2019. 67p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, SP.

ABSTRACT

Leptospirosis remains one of the most prevalent bacterial zoonosis worldwide, particularly among tropical countries. Due to the peculiar properties of leptospires, the diagnosis is neglected or unnoticed in livestock. Also, the majority of studies involving bovine leptospirosis have focused on the disease in cows. Given the considerable risk of infections in the reproductive tract of bulls and semen-shedding of leptospires, the present study investigated serum microscopic agglutination test (MAT) among 203 bovine bulls reproductively mature, in natural breeding of farms, without apparent signs of orchitis or inflammation of accessory reproductive glands. Simultaneously, the semen of all bulls was subjected to sperm viability analysis and conventional polymerase chain reaction (PCR) based on the gene *16S rRNA*. PCR-positive results of semen samples were confirmed by sequencing. Modified seminal plasma agglutination (MSPA) test replacing blood serum of all bulls by plasma seminal in MAT was assessed as well. Eight (8/203=3.9%) semen bulls were considered improper for reproduction service (necropermia and azoospermia). No agglutinins titers were identified among all bulls subjected to MSPA. High frequency (132/203=65%) of leptospiral agglutinins titers were identified at MAT, particularly to serovars from Sejroe serogroup, e.g., Hardjo CTG (100/203=49.3%), Wolffi (74/203=36.4%), Guaricura (72/203=35.5%), and Hardjoprajitno (56/203=27.6%). Three (3/203=1.5%) semen of bulls were positive to PCR *16S* gene, whereas these animals were negative to confirmation by sequencing. The high frequency of serovars from Sejroe serogroup, which are adapted to bovine species, indicate the need for periodic diagnosis, in addition to prophylactic and control measures against the disease, particularly to avoid transmission of the pathogen bovine-to-bovine, economic losses related to a

reproductive failure caused by leptospires, and public health issue of the disease. To our knowledge, semen viability analysis, the investigation of anti-*Leptospira* antibodies by modified seminal plasma agglutination, and sequencing as confirmation test of semen PCR-positive were assessed for the first time on the diagnosis of leptospirosis in bovine bulls.

Key-words: bovine leptospirosis, seroprevalence, molecular diagnosis, breeding soundness evaluation.

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença infectocontagiosa causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*, que acomete ampla variedade de animais domésticos, silvestres e selvagens (ELLIS, 2015). Em humanos é considerada uma das zoonoses de origem bacteriana mais prevalentes e preocupantes em todo mundo, emergente em vários países, particularmente de clima tropical e em desenvolvimento (COSTA et al., 2015).

O gênero *Leptospira* foi inicialmente dividido em duas espécies, *L. interrogans* e *L. biflexa*, representadas por espécies patogênicas e saprófitas, respectivamente; contendo cerca de 24 sorogrupos e mais de 250 sorovares agrupados por testes de aglutinação (ADUGNA, 2016; CONSTABLE et al., 2016). Nas últimas décadas, *L. interrogans* foi reclassificada em genoespécies (genomoespécies) baseada em técnica de hibridização de DNA (ZARANTONELLI et al., 2018).

Hardjo é o sorovar mais adaptado a espécie bovina em todo o mundo (LUCCHESE et al., 2016). No entanto, dependendo principalmente das condições edafoclimáticas, manejo dos animais e contato interespecies, outros sorovares como Pomona, Grippotyphosa, Bratislava, Icterohaemorrhagiae e Guaricura (LOUREIRO et al., 2016; PRAJAPATI et al., 2018) podem ocorrer nos rebanhos. Com o avanço das técnicas moleculares aplicadas a taxonomia e diagnóstico dos micro-organismos, dois genótipos distintos do sorovar Hardjo - sorologicamente indistinguíveis - foram classificados, a saber: *L. interrogans* sorovar Hardjo tipo Hardjoprajitno (anteriormente denominado sorovar Hardjoprajitno) e *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo tipo Hardjobovis (anteriormente denominado sorovar Hardjobovis) (LLANES et al., 2016).

Em bovinos, a transmissão do patógeno ocorre pelo contato com mucosas, pele e conjuntiva com a urina de animais infectados, e pela ingestão de água e alimentos contaminados (FAVERO et al., 2017). O micro-organismo é eliminado pelo sêmen de touros, podendo ser transmitido pela monta natural, inseminação artificial com sêmen contaminado ou outras biotécnicas de reprodução (ADUGNA, 2016). A resistência do micro-organismo no ambiente - como solo e água - aliada a períodos de alta pluviosidade e quentes do ano, resultam em aumento sazonal do número de casos da doença (MARTINS e

LILENBAUM, 2017; CORREIA et al., 2017), particularmente em países de clima tropical (PETRAKOVSKY et al., 2014).

Abortamentos, natimortos, nascimento de bezerros fracos, redução súbita da produção de leite e infertilidade são os principais sinais clínicos e causas de prejuízos econômicos relacionados com a leptospirose como doença da esfera reprodutiva em bovinos (MARTINS e LILENBAUM, 2017; CONSTABLE et al., 2016).

O diagnóstico de rotina da doença usualmente é baseado nos dados epidemiológicos, sinais clínicos e técnicas laboratoriais como isolamento microbiano, microscopia de campo escuro e/ou sorodiagnóstico pela técnica de soroaglutinação microscópica com antígenos vivos (SAM) (ADUGNA, 2016). Apesar da baixa relação entre a classificação sorológica (antigênica) e a de origem genética (molecular), o método sorológico ainda tem sido amplamente utilizado em estudos soroepidemiológicos e na rotina de diagnóstico da doença (PRAJAPATI et al., 2018).

Nas últimas décadas, técnicas moleculares como a reação em cadeia pela polimerase convencional (PCR), real-time PCR (LEVETT et al., 2005), hibridização de DNA e sequenciamento têm possibilitado a reclassificação taxonômica do agente e o diagnóstico específico em diferentes espécimes clínicos (ADUGNA, 2016; ZARANTONELLI et al., 2018). Recentemente, a análise do genoma total de *Leptospira* (pangenoma) tem proposto a diferenciação do patógeno em clades (organismos derivados de ancestral comum), a saber: patogênicos, intermediários e saprófitas (THIBEAUX et al., 2018).

A maioria dos estudos com a leptospirose bovina em todo mundo têm focado o sorodiagnóstico da doença em vacas (PRAJAPATI et al., 2018; ZARANTONELLI et al., 2018; MIASHIRO et al., 2018). Apesar de estar bem estabelecido que as leptospirosas possam ser transmitidas pelo sêmen (ADUGNA, 2016), número restrito de estudos, em todo mundo, investigaram a soroprevalência da doença em touros bovinos e/ou avaliaram os riscos de eliminação do patógeno pelo sêmen baseado em técnicas moleculares (HEINEMMAN et al., 1999, 2000; CAMPOS JÚNIOR et al., 2006; MAGAJEVSKI et al., 2006; GANDA et al., 2016). Não há consenso nestes estudos entre a identificação do agente no soro ou sêmen utilizando diferentes técnicas de

diagnóstico. Neste contexto, não foi identificado - dentre a literatura consultada - estudos que investigaram a presença de aglutininas anti-*Leptospira* no sêmen dos touros ou alterações no exame andrológico dos animais reagentes (ou infectados), que pudessem influenciar na viabilidade do sêmen para uso na reprodução.

Neste cenário, o soro de 203 touros adultos em atividade de reprodução a campo - sem sinais aparentes de inflamação no trato reprodutivo - foi submetido ao diagnóstico sorológico pela técnica padrão de SAM. Simultaneamente, o sêmen dos touros foi submetido ao exame andrológico, ao diagnóstico molecular pela PCR, sequenciamento e a sêmen plasma aglutinação modificada, substituindo o soro pelo plasma seminal na técnica de SAM.

2. *Leptospira* spp.: TAXONOMIA E PROPRIEDADES GERAIS

As leptospiros são espiroquetas que pertencem a família Leptospiraceae, que contempla espécies saprófitas e patogênicas para animais e humanos (CERQUEIRA e PICARDEAU, 2009; QUINN et al., 2011). O termo leptospira é derivado da palavra grega “leptós” (delgado) e do termo “spira”, do latim (forma de espiral) (PAES, 2016). As leptospiros apresentam morfologia peculiar em espiral ou helicoidal, flexíveis, finas ou delgadas, com extremidade em forma de gancho (QUINN et al., 2011) ou ponto de interrogação, que motivou o nome da espécie *L. interrogans*.

Medem entre 6 e 20 µm de comprimento e 0,1 a 0,2 µm de largura. Possuem mobilidade por filamento axial ou endoflagelos localizados no espaço periplasmático, que proporcionam movimentos de flexão e extensão, visualizados em microscopia de campo escuro ou contraste de fase (QUINN et al., 2011; GENOVEZ, 2016). Apresentam estrutura de parede de bactérias Gram-negativas, mas não se coram de forma alguma pelo método de Gram, sendo necessário corantes a base de sais de prata para a visualização do agente, que assume coloração enegrecida (PAES, 2016).

São bactérias aeróbias isoladas entre 28 e 30°C, em pH de 7,2 a 7,6, requerendo meios especiais como o semissólido de Fletcher e os meios de Stuart e EMJH (Ellinghausen, MacCullough, Johnson e Harris). Nos meios semissólidos, a multiplicação das leptospiros é visualizada macroscopicamente pela formação de área de turvação denominada anel de Dinger, localizada entre 0,5 e 1 cm da superfície do meio (QUINN et al., 2011; GENOVEZ, 2016). O agente é sensível a ambientes secos e inativado quando exposto a temperaturas superiores a 60°C, luz solar direta, fervura, extremos de pH e alta salinidade (PAES, 2016).

A classificação taxonômica é complexa e objeto de divergências entre os pesquisadores. Com base na identificação de antígenos de superfície identificados por métodos sorológicos, por décadas, o gênero *Leptospira* foi classificado em espécies patogênicas e saprófitas denominadas, respectivamente, *L. interrogans* e *L. biflexa*, que contemplam espécies que acometem humanos e animais (QUINN et al., 2011). Nesta classificação sorológica (ou antigênica) o sorovar é considerado a unidade taxonômica básica.

Sorovares que possuem similaridade antigênica são agrupados em sorogrupos. São reconhecidos cerca de 24 sorogrupos e mais de 250 sorovares determinados por testes de aglutinação (PAES, 2016; ADUGNA, 2016; CONSTABLE et al., 2016).

Hardjo é o sorovar mais adaptado a espécie bovina em todo o mundo (LUCCHESI et al., 2016). No entanto, outros sorovares como Pomona, Grippotyphosa, Bratislava, Icterohaemorrhagiae e Guaricura podem ocorrer nos rebanhos, devido às variações nas condições climáticas, pH e constituição do solo em diferentes regiões e países (LOUREIRO et al., 2016; PRAJAPATI et al., 2018).

Com o avanço das técnicas de biologia molecular, nas últimas duas décadas a espécie *L. interrogans* foi reclassificada em mais de 10 genoespécies com base em técnicas de homologia de DNA (GENOVEZ, 2016; CONSTABLE et al., 2016; ZARANTONELLI et al., 2018). Em cada genoespécie são encontrados vários sorovares não havendo, portanto, concordância total entre a classificação antigênica (sorológica) e a genética (molecular) (CONSTABLE et al., 2016; PAES, 2016), fato que gera certa dificuldade na homogeneização taxonômica do agente. No entanto, apesar desta divergência, o método sorológico é amplamente utilizado em estudos soropidemiológicos (PRAJAPATI et al., 2018), bem como é o teste recomendado pela Organização Mundial da Saúde Animal (do inglês *World Organisation for Animal Health-OIE*) na rotina de diagnóstico da doença em animais (OIE, 2018).

Em particular, dois tipos genéticos distintos do sorovar Hardjo - considerado mais importante para bovinos - foram identificados: *L. interrogans* sorovar Hardjo tipo Hardjoprajitno (anteriormente denominado sorovar Hardjoprajitno) e *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo tipo Hardjobovis (anteriormente denominado sorovar Hardjobovis) (LLANES et al., 2016; MARTINS e LILENBAUM, 2017).

Mais recentemente, a análise do genoma total de *Leptospira* (pangenoma) tem proposto o reagrupamento da bactéria em clades denominados patogênicos, intermediários e saprófitas (THIBEAUX et al., 2018). Nesta nova classificação, as espécies não patogênicas seriam representadas por *L. biflexa*, *L. meyeri* e *L. wolbachii*, enquanto as intermediárias por *L. inadai*, *L. fainei*, *L. broomii*, *L. licerasiae* e *L. wolffii*. Sendo consideradas espécies patogênicas, *L. interrogans*,

L. kirschneri, *L. noguchii*, *L. alexanderi*, *L. weilii*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. kmetyi*, *L. canicola*, *L. grippotyphosa*, *L. icterohaemorrhagiae* e *L. Pomona* (GENOVEZ, 2016; PAES, 2016).

3. LEPTOSPIROSE BOVINA

A leptospirose é uma das principais doenças infectocontagiosas que acometem a criação da espécie bovina em virtude, principalmente, dos prejuízos causados com distúrbios da esfera reprodutiva, por abortamentos, queda abrupta na produção de leite, morte ocasional de animais e riscos em saúde pública (ELLIS, 2015; GENOVEZ, 2016; CONSTABLE et al., 2016).

3.1 Epidemiologia

A leptospirose é uma doença endêmica em países de clima tropical e subtropical, que favorecem a manutenção do agente no ambiente. A resistência do micro-organismo no ambiente - como água e solo - aliada a períodos de alta pluviosidade e quentes do ano, resultam em aumento sazonal do número de casos da doença (MARTINS e LILENBAUM, 2017; CORREIA et al., 2017).

A sobrevivência no solo é maior em pH próximo ao neutro ou levemente alcalino e em faixas de temperatura que variam entre 0 e 25°C. Quando eliminado na urina o patógeno sobrevive, transitoriamente, em condições relativamente ácidas da urina (PAES, 2016).

A epidemiologia da leptospirose bovina é complexa em virtude de características peculiares do agente, participação de outros animais domésticos e silvestres no ciclo biológico e influência dos fatores edafoclimáticos na manutenção ambiental do agente (MILLAN et al., 2008; LILENBAUM e MARTINS, 2014).

Convencionalmente, a epidemiologia da leptospirose pode ser entendida subdividindo os animais em hospedeiros adaptados e não adaptados. A exposição de hospedeiros adaptados a diferentes espécies e sorovares de *Leptospira* resulta em animais que servem como reservatórios ou hospedeiros de manutenção do patógeno (LOUREIRO et al., 2016). Em contraste, a infecção de animais por sorovares não adaptados determina geralmente sinais clínicos da doença, também chamados de hospedeiros acidentais ou incidentais. Os sorovares de *Leptospira* se adaptam a um ou poucos hospedeiros, embora potencialmente possam causar doença em várias espécies de animais (CORREIA et al., 2017).

Os hospedeiros de manutenção ou reservatórios se caracterizam por alta susceptibilidade a infecção, transmissão endêmica interespecie, baixa patogenicidade do sorovar ao hospedeiro, tendência de infecções subclínicas ou crônicas, persistência do patógeno nos rins, eliminação renal prolongada e baixa resposta sorológica a infecção. Em contraste, os hospedeiros acidentais ou incidentais comumente apresentam menor susceptibilidade a infecção, tendência de doença aguda ou hiperaguda, transmissão esporádica interespecie, curta eliminação renal e elevada resposta sorológica (CONSTABLE et al., 2016).

Na espécie bovina, a transmissão das leptospiros ocorre por via direta principalmente pelo contato de mucosas (conjuntival, nasal, geniturinária) e pele (íntegra ou lesada) com a urina de animais infectados. De modo indireto, o patógeno pode ser veiculado pela ingestão de água e alimentos contaminados (FAVERO et al., 2017).

As leptospiros também são eliminadas pelo sêmen dos touros, podendo transmitir o patógeno pela monta natural, inseminação artificial com sêmen contaminado ou por outras biotécnicas da reprodução (ADUGNA, 2016).

O livre acesso dos animais a coleções de água estagnadas e pastos contaminados, a introdução de animais reservatórios, a criação consorciada de bovinos com outras espécies de animais domésticos (pequenos ruminantes, equinos, suínos e cães), bem como a proximidade de pastos com matas nativas que apresentem animais silvestres/selvagens, são fatores que podem contribuir para a infecção dos bovinos e a manutenção da doença de modo endêmico nas propriedades rurais (GENOVEZ, 2016; MARTINS e LILENBAUM, 2017).

3.2 Aspectos de patogenia e imunidade

A patogenicidade do agente em bovinos está diretamente relacionada ao sorovar e/ou genoespécie de leptospiros, carga bacteriana infectante, virulência do patógeno e *status* imune do hospedeiro. Em geral, a doença é mais grave em animais jovens e em hospedeiros incidentais (EVANGELISTA e COBURN, 2010; CONSTABLE et al., 2016).

A presença de endotoxinas (lipopolissacarídeos - LPS) de membrana (CULLEN et al., 2004), adesinas, exotoxinas e hemolisinas, além de proteínas

de superfície (fibronectina) - que possuem capacidade de ligação às células do endotélio de vasos e hemácias -, são referidos como os principais fatores de virulência responsáveis pela patogenicidade do agente nas infecções em bovinos (QUINN et al., 2011; ADUGNA, 2016; GENOVEZ, 2016). Ademais, o patógeno possui capacidade de evadir da fagocitose por induzir a apoptose de macrófagos (QUINN et al., 2011).

As lesões provocadas no endotélio vascular e hemácias estão associadas com a presença de anemia, hemoglobinúria e hemorragias em tecidos (fígado, pulmões, rins, baço, encéfalo). As toxinas produzidas pelas leptospiros causam disfunção e necrose hepática, resultando em icterícia em animais com infecções graves. Vasculite e hemorragias podem causar sinais graves nos pulmões (PAES, 2016).

Após a invasão por mucosas, conjuntiva, pele ou por via oral, o micro-organismo se dissemina por via hemática (leptospiremia) e linfática, podendo se localizar em vários órgãos e tecidos (fígado, pulmões, rins, baço, meninges, câmara anterior dos olhos) (JANWITTHAYANAN et al., 2013; ADLER, 2014). Em vacas, o patógeno pode atravessar a placenta e infectar o feto em qualquer estágio da gestação (com predomínio no terço final), causando perdas embrionárias, abortamentos, natimortos ou nascimento de fetos fracos e doentes (RAO et al., 2003; GENOVEZ, 2016). No entanto, na literatura consultada, não foram encontradas informações específicas acerca das lesões provocadas por leptospiros no testículo e glândulas acessórias de touros.

Particularmente no tecido renal, o agente não sofre ação adequada do sistema imune, em virtude da dificuldade dos fagócitos e anticorpos de transporem a barreira glomerular, resultando na permanência do agente nos túbulos contornados renais e eliminação para o ambiente pela urina – leptospirúria (GENOVEZ, 2016). A eliminação pela urina dos bovinos pode ocorrer poucos dias após a infecção e perdurar, de modo intermitente, em média, 36 dias (10-118 dias); com maior eliminação nos primeiros dias de leptospirúria (CONSTABLE, 2016). As lesões no epitélio renal provocam diminuição da perfusão renal e insuficiência renal aguda (PAES, 2016).

A imunidade humoral dos animais naturalmente infectados está associada com o nível de produção de imunoglobulinas (Ig) das classes IgM e IgG, direcionadas principalmente aos antígenos de superfície e LPS das leptospiros,

promovendo a opsonização e favorecendo, conseqüentemente, a inativação do agente (QUINN et al., 2011; ELLIS, 2015). Ig das classes IgM e IgG são produzidas quase que, simultaneamente, entre 7 e 10 dias pós-infecção (PI). IgM é mais precoce, atingindo pico com cerca de duas semanas e decrescendo aproximadamente com 30 dias PI. Altos níveis de IgM caracterizam animais em fase inicial de infecção (CONSTABLE et al., 2016).

As imunoglobulinas da classe IgG (principalmente subclasse IgG₁) são detectadas com cerca de 10 dias PI e atingem pico com aproximadamente 21 dias (ADUGNA, 2016; GENOVEZ, 2016), mantendo-se nos animais naturalmente infectados por período variável, tendendo a declinar antes de 11 meses PI (CONSTABLE et al., 2016). Animais com baixos títulos de Ig podem desenvolver graves sinais renais, hepáticos e pulmonares, enquanto animais com altos títulos podem debelar o agente poucos dias após a infecção e geralmente não manifestam sinais clínicos (PAES, 2016).

Em animais vacinados, os títulos de IgM e IgG pós-vacinais são relativamente baixos (entre 100 e 400), transitórios, e persistem entre 4 (CONSTABLE et al., 2016) e 6 meses pós vacinais (GENOVEZ, 2016).

Até recentemente aceitava-se que a imunidade diante das leptospiros era fundamentalmente de origem humoral (ADLER, 2014). No entanto, mais recentemente tem se observado a participação de citocinas - como o fator de necrose tumoral e interferon gama - na resposta celular contra as leptospiros, principalmente em infecções pelo sorovar Hardjo (CONSTABLE et al., 2016). A liberação do fator de necrose tumoral estaria relacionada aos danos teciduais nas infecções graves pelo patógeno (QUINN et al., 2011). Nas lesões renais, lipoproteínas da membrana bacteriana ligam-se a receptores *tool-like*, culminando com a liberação de óxido nítrico, que resulta em lesão endotelial (PAES, 2016).

3.3 Clínica

O período de incubação é considerado curto, entre 3 e 7 dias nos bovinos, no qual os animais doentes podem apresentar sinais agudos, subagudos e crônicos. No entanto, na grande maioria dos animais, prevalecem infecções subclínicas (ADUGNA, 2016).

Febre (40,5-41,5°C), anemia, inapetência ou anorexia, petéquias em mucosas, dispneia, icterícia e hemoglobinúria são sinais clínicos observados nos bovinos com doença aguda (leptospirose), principalmente em bezerros, geralmente causados por sorovares incidentais (ou acidentais) como Pomona (CONSTABLE et al., 2016), Grippotyphosa e Icterohaemorrhagiae (PRAJAPATI et al., 2018).

Redução abrupta na produção de leite ou agalaxia (do inglês, *milk drop syndrome*), com presença de grumos e alterações da cor do leite (amarelado ou com estrias de sangue) e flacidez da glândula mamária podem ser observados em infecções agudas por leptospira, em vários animais do rebanho, com retorno a produção entre 7 e 10 dias, embora a redução na produção possa se prolongar por várias semanas (GENOVEZ, 2016). Os sinais clínicos nos casos subagudos assemelham-se com os observados na forma aguda, mas de menor intensidade (ADUGNA, 2016).

Nos bovinos, abortamentos, natimortos, nascimento de bezerros fracos e sub ou infertilidade são os principais sinais clínicos e causas de prejuízos econômicos relacionados com a leptospirose como doença da esfera reprodutiva (ELLIS, 2015; MARTINS e LILENBAUM, 2017). Os abortamentos podem ocorrer na forma aguda (surtos) ou crônica da doença, em qualquer período gestacional, embora predominem no terço final de gestação (ADUGNA, 2016). Na forma crônica, os casos de abortamentos comumente são causados pelo sorovar Pomona, acompanhados pela redução nos índices de fertilidade do rebanho. A ocorrência de abortamentos pode exceder 30% das vacas infectadas (ADUGNA, 2016; CONSTABLE et al., 2016).

As infecções pelo sorovar Hardjo - adaptado a espécie bovina - geralmente são mais brandas (se comparadas aos sorovares não adaptados) e manifestam-se por febre, inapetência, sinais na glândula mamária, subfertilidade dos rebanhos e, ocasionalmente, abortamentos (ADUGNA, 2016).

A morbidade da leptospirose em bovinos varia entre 10 e 30%, com mortalidade abaixo de 5%, notadamente nos casos que a leptospira produz bacteremia (CONSTABLE et al., 2016).

3.4 Diagnóstico

O diagnóstico de rotina da leptospirose bovina usualmente é firmado com base nos dados epidemiológicos, clínicos e técnicas laboratoriais - diretas ou indiretas - como isolamento microbiano, microscopia de campo escuro, histopatologia e/ou sorodiagnóstico pela técnica padrão de SAM (SUMAN e KHALID, 2014; ADUGNA, 2016; PRAJAPATI et al., 2018). Nas últimas décadas, as técnicas moleculares têm possibilitado a reclassificação do agente, descrição de novos genoespécies e o diagnóstico específico em diferentes tipos de espécimes clínicos - incluindo abortamentos - ainda que o agente não esteja viável no material amostrado (ELLIS, 2015; ZARANTONELLI et al., 2018; THIBEAUX et al., 2018).

3.4.1 Cultivo microbiológico

O isolamento microbiano é definitivo no diagnóstico direto da doença, considerado “padrão ouro” pela Organização Mundial da Saúde Animal (WHO, 2018). O isolamento das leptospiros pode ser obtido de sangue, urina, sêmen e vários órgãos e tecidos (rins, pulmões, fígado, cérebro) de animais e fetos (CONSTABLE et al., 2016; PRAJAPATI et al., 2018). Micro-organismos do gênero *Leptospira* são lábeis e exigentes quanto às condições de isolamento laboratorial, fato que resulta em riscos de contaminação dos espécimes clínicos com outras bactérias convencionais e insucessos no isolamento, dificultando o diagnóstico microbiológico (MAGAJEVSKI et al., 2005; SUMAN e KHALID, 2014). Com efeito, o isolamento microbiano das leptospiros está limitado a número restrito de laboratórios, que possuem pessoal qualificado para o cultivo do agente, atendendo a rigorosas condições de biossegurança (SUMAN e KHALID, 2014).

3.4.2 Microscopia de campo escuro

A visualização direta do patógeno em microscopia de campo escuro ou contraste de fase em amostras de urina é outro método direto de diagnóstico (AHMAD e SHAH, 2005), embora necessite que o animal esteja em fase de leptospiúria para a visualização do patógeno, fato que restringe o sucesso deste procedimento diagnóstico (QUINN et al., 2011). Exames histopatológicos em amostras de tecidos conservadas em formol coradas por sais de prata como

Warthin Starry, ou por conjugados fluorescentes, também possibilitam o diagnóstico direto das leptospiros (MAGAJEVSKI et al., 2005; GENOVEZ, 2016).

3.4.3 Soroaglutinação microscópica com antígenos vivos

A SAM é o principal teste sorológico utilizado na rotina de diagnóstico indireto da leptospirose em animais (QUINN et al., 2011; ELLIS, 2015). Este método é baseado na reação de aglutinação sorogrupo-específica de Ig das classes IgM e IgG (ADUGNA, 2016). Utiliza leptospiros vivos como antígeno, mantidas em coleções de culturas. Deve ser utilizado pelo menos um representante - de sorovar - de cada sorogrupo de importância nas infecções na espécie-alvo. No entanto, devido à similaridade de antígenos, sorovares pertencentes ao mesmo grupo - como Hardjo e Wolffi - podem apresentar reações cruzadas (coaglutinação) (COSTA et al., 1998; GENOVEZ, 2016).

Apesar de não haver consenso entre os pesquisadores, o título sorológico (ponto de corte) aceito para que o animal seja considerado reagente é, em geral, 100 (HEINEMANN et al., 1999; CONSTABLE, 2016). Testes sorológicos pareados, em intervalos de 15 a 30 dias, com aumento de quatro vezes o título, são considerados conclusivos no diagnóstico sorológico (sorologia pareada) (GENOVEZ, 2016; CONSTABLE et al., 2016). Entretanto, por vezes, não é possível realizar a sorologia pareada - como em casos de abortamentos - e títulos altos para sorovares importantes para a espécie alvo (e.g. título ≥ 400) devem ser considerados como infecção quando acompanhados de sinais clínicos compatíveis (QUINN et al., 2011).

O teste de SAM é particularmente útil no diagnóstico sorológico de infecções clínicas em bovinos por sorovares incidentais (acidentais) e em casos agudos da doença (ADUGNA, 2016). No entanto, a técnica é laboriosa e requer a manutenção de coleções vivas de leptospiros. A bactéria é lábil em condições de laboratório e existem riscos de contaminação dos operadores. O conjunto destes fatores limita o uso desta técnica a laboratórios especializados (PINTO et al., 2016). A principal limitação de uso da SAM reside, provavelmente, na incapacidade de diferenciação de animais vacinados daqueles infectados (CONSTABLE et al., 2016). Animais cronicamente infectados, particularmente por sorovares adaptados (como Hardjo), resultam em títulos baixos na SAM e

em infecções subclínicas (ADUGNA, 2016; GENOVEZ, 2016), dificultando sobremaneira o diagnóstico.

Hardjo é o sorovar mais prevalente em estudos sorológicos da leptospirose bovina em todo o mundo (ADUGNA, 2016; CONSTABLE et al., 2016; PRAJAPATI et al., 2018; ZARANTONELLI et al., 2018).

No Brasil, as investigações de soroprevalência da leptospirose têm sido conduzidas majoritariamente com vacas. Estudos em cinco regiões do país têm revelado o predomínio do sorovar Hardjo (tipos Hardjoprajitno e Hardjobovis), seguido por Wolffi e, ocasionalmente, outros sorovares (GENOVEZ, 2016) como Grippotyphosa, Bratislava, Shermani e Icterohaemorrhagiae (Tabela 1); nos quais entre 38-97% dos animais foram reagentes para pelo menos um sorovar (HOMEM et al., 2000; JULIANO et al., 2000; CASTRO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009; FIGUEIREDO et al., 2009; HASHIMOTO et al., 2012; HERMANM et al., 2012; MIASHIRO et al., 2018).

Particularmente no estado de São Paulo, Langoni et al. (2000) ao avaliarem o perfil da leptospirose em 2.761 bovinos, fêmeas e machos, observaram 45,6% de animais reagentes (para pelo menos um sorovar), principalmente para os sorovares Wolffi (70,6%), Hardjo (67,6%), Pyrogenes (27,9%), Canicola (25,9%), Bratislava (23%) e Pomona (10,8%). O mesmo estudo revelou que a soroprevalência foi maior em fêmeas (47,5%), em animais destinados a produção de leite (24%).

Nos casos de abortamentos por sorovares incidentais os títulos geralmente são altos, ao contrário dos sorovares adaptados. Em vacas abortadas, a sorologia pareada tem valor limitado, pois as fêmeas foram infectadas há várias semanas e geralmente apresentam títulos em declínio (ADUGNA, 2016; CONSTABLE et al., 2016).

TABELA 1. Prevalência da leptospirose em vacas e principais sorovares diagnosticados pela técnica de soroaglutinação microscópica com antígenos vivos em rebanhos das cinco regiões do Brasil. 2000-2019.

Estado	Prevalência	Sorovares reagentes	Nº de rebanhos	Nº de animais	Referência
Goiás ¹	81,9%	Wolffi (36,1%); Icterohaemorrhagiae (20,5%); Hardjo (5,2%)	ND	426	Juliano et al. (2000)
Pará ²	97%	Hardjo (61,2%); Bratislava (9%); Shermani (4,5%)	67	ND	Homem et al. (2000)
São Paulo	49,4%	Hardjo (46%); Wolffi (21%); Shermani (8,9%)	1.021	8.216	Castro et al. (2007)
Bahia	45,42%	Hardjoprajitno (14,9%); Shermani (4,9%); Wolffi (3,6%)	1.414	10.823	Oliveira et al. (2009)
Mato Grosso do Sul	96,5%	Hardjo (65,6%); Wolffi (12,3%)	178	2.573	Figueiredo et al. (2009)
Paraná	66,06%	Hardjo (54,7%); Grippytyphosa (7,7%); Shermani (7,2%)	274	1.880	Hashimoto et al. (2012)
Mato Grosso do Sul ³	79,8%	Hardjo (28,4-63,6%); Wolffi (7,7-16,1%); Grippytyphosa (2,6-5,8%);	246	2.766	Miashiro et al. (2018)

Municípios = ¹Goiânia; ²Uruará; ³Aquidauana, Bodoquena, Corumbá, Ladário, Rio Verde; ND = não divulgado; Nº = número

3.4.4 Outros testes sorológicos

Testes como aglutinação macroscópica (macroaglutinação), diferentes tipos de *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) e com proteínas recombinantes foram desenvolvidos para o diagnóstico da leptospirose bovina (GENOVEZ, 2016).

O ELISA possui como vantagem a automação, propiciando testar muitos animais simultaneamente. Podem diferenciar IgM de IgG, possibilitando distinguir animais infectados de vacinados (SUMAN e KALID, 2014; ADUGNA, 2016). O ELISA IgG mostrou-se mais sensível e específico que a SAM (PATEL et al., 2017). Ainda, o teste de ELISA pode detectar Ig da classe IgM mais precocemente que os testes de aglutinação (CONSTABLE et al., 2016).

3.4.5 Diagnóstico molecular

As técnicas moleculares como a PCR convencional, real-time PCR (LEVETT et al., 2005) e a hibridização de DNA têm possibilitado a reclassificação taxonômica do agente e o diagnóstico rápido, sensível e específico em diferentes tecidos e humores orgânicos (ADUGNA, 2016; ZARANTONELLI et al., 2018). Eletroforese em campo pulsado, uso de enzimas de restrição (PRAJAPATI et al., 2018) e espectrofotometria de massas (MALDI-TOF) (THIBEAUX et al., 2018) também foram utilizados em estudos epidemiológicos da leptospirose bovina.

Grande variedade de *primers* têm sido desenhados para o diagnóstico do gênero *Leptospira* ou para detecção das espécies do agente. A PCR foi efetiva na detecção de leptospiros na urina de bovinos com doença crônica. Multiplex PCR tem sido efetiva na detecção do agente em fetos abortados (CONSTABLE et al., 2016). No entanto, a PCR não detecta os sorovares, que podem ser identificados por técnicas de sequenciamento parcial e total. A análise recente do genoma total de *Leptospira* (projeto Pangenoma) tem proposto a diferenciação do patógeno em clades, reagrupando o agente em patogênicos, intermediários e saprófitas (THIBEAUX et al., 2018).

3.4.6 Achados de necropsia e histopatológico

Anemia, icterícia, hemorragias e edema são os principais achados de necropsia em mucosas e órgãos de animais com evolução aguda da leptospirose. O exame histopatológico caracteriza-se por nefrite intersticial difusa, necrose hepática e hemorragias em órgãos (pulmões, meninge, baço). Fetos abortados apresentam-se hemorrágicos ou autolisados. É possível observar, ainda, edema gelatinoso hemorrágico subcutâneo, hemorragias e congestão de órgãos, líquido serosanguinolento em cavidades e necrose renal (CONSTABLE et al., 2016).

3.4.7 Diagnóstico diferencial

A leptospirose bovina deve ser diferenciada de doenças que causam anemia e hemoglobinúria como babesiose e hemoglobinúria bacilar. Outras causas de abortamentos em bovinos, principalmente no terço médio e final de gestação (ADUGNA, 2016), como neosporose, brucelose e rinotraqueíte

infecciosa bovina devem ser diferenciadas da leptospirose (CONSTABLE et al., 2016).

3.4.8 Sêmen plasma aglutinação

A sêmen plasma aglutinação é um teste padronizado para o diagnóstico da brucelose bovina, que identifica Ig das classes IgA e IgM. Este método é baseado no uso do plasma seminal em substituição ao soro, em testes sorológicos convencionais (CASAS OLASCOAGA, 1976; PAULIN, 2003). A aplicabilidade da sêmen plasma aglutinação recai no fato de que *Brucella abortus* possui predileção pelo trato reprodutivo dos touros bovinos - particularmente as glândulas acessórias dos machos - que pode resultar em baixos títulos séricos ou até ausência de títulos sistêmicos, ainda que os touros estejam infectados e eliminando brucelas pelo sêmen (VASCONCELLOS et al., 1987). No entanto, tal hipótese de produção de Ig anti-*Leptospira* no ejaculado de touros infectados, substituindo o soro pelo plasma seminal no teste de SAM, até o presente não foi objeto de estudo.

3.5 Tratamento e controle

O tratamento com antimicrobianos é uma das principais medidas na abordagem dos casos de leptospirose em animais e humanos (MIRAGLIA et al., 2013; GENOVEZ, 2016).

Antimicrobianos do grupo dos beta-lactâmicos e derivados (penicilina, ampicilina, amoxicilina, ceftiofur, cefotaxime), tetraciclina, aminoglicosídeos (estreptomicina) e macrolídeos (tilosina, eritromicina) possuem ação contra as leptospirosas (GIGUÈRE et al., 2010; CONSTABLE et al., 2016). Em bovinos, dihidroestreptomicina (25 mg/kg, IM), dose única ou em três aplicações, tem sido amplamente recomendada por atingir concentrações terapêuticas renais e evitar o estado de animais portadores nos rebanhos (ALT et al., 2001; GENOVEZ, 2016).

O controle da leptospirose bovina é complexo devido à resistência do agente no ambiente, do envolvimento de animais silvestres no ciclo epidemiológico, da possibilidade de infecção por pasto e água contaminados, e da interação dos bovinos com outros animais domésticos, que podem servir como fontes de infecção (MARTINS e LILENBAUM, 2017). Neste contexto, os

principais pilares do controle da doença são representados pelo tratamento dos animais doentes, vacinação e medidas de manejo. As ações de manejo incluem a adoção de quarentena para animais recém-adquiridos ou que regressaram às propriedades, isolamento e tratamento dos animais infectados, drenagem de pastos e regiões alagadiças, diagnóstico de causas de abortamentos e destino adequado de fetos (enterro em vala sanitária), controle de roedores (GENOVEZ, 2016; PRAJAPATI et al., 2018), evitar a criação consorciada de espécies domésticas e a proximidade dos pastos com matas nativas, desinfecção ambiental (LEVETT, 2001), bem como a adoção de vacinação (MARTINS e LILENBAUM, 2017).

Fêmeas doadoras e receptoras de embriões devem obedecer às normas sanitárias da OIE e da sociedade de transferência de embriões (GENOVEZ, 2016). Recomenda-se o uso de sêmen de centrais de inseminação livres dos principais sorovares que acometem os bovinos (ADUGNA, 2016). São recomendados, também, testes diagnósticos periódicos em touros utilizados na monta natural, inseminação artificial ou outras biotécnicas da reprodução (PRAJAPATI et al., 2018), posto que o patógeno pode sobreviver em temperaturas de congelamento utilizadas na estocagem do sêmen (EAGLESOME e GARCIA, 1992).

A vacinação representa uma das principais ações de controle da doença em bovinos (BONDURANT, 2005; KOIZUMI e WATANABE, 2005; ADLER, 2014). A adoção da vacinação em bovinos é recomendada na profilaxia dos rebanhos ou para propriedades endêmicas, com diagnóstico confirmado da doença. As vacinas comerciais utilizadas na prevenção da doença são bacterinas e devem conter todos os sorovares de importância para a espécie-alvo da região ou país, pois a imunidade é sorovar-específica (ADLER, 2010). Muitas bacterinas estão disponíveis comercialmente em todo mundo contendo entre 5 e 10 sorovares (MARTINS e LILENBAUM, 2017). A imunidade pós-vacinal não é duradoura, persistindo por, no máximo, 12 meses. As vacinas reduzem os episódios de abortamentos e a gravidade dos sinais clínicos. Entretanto, não impedem a infecção e a eliminação do patógeno pela urina (CONSTABLE et al., 2016).

Recomenda-se que bezerros recebam a primeira dose entre 4 e 6 meses de idade, com reforço 21 a 30 dias depois (GENOVEZ, 2016), seguido de

revacinações semestrais ou anuais, dependendo do manejo da propriedade e fluxo de animais (RINEHART et al., 2012; PRAJAPATI et al., 2018). Vacas devem ser revacinadas dois meses antes do parto para induzir imunidade passiva ao bezerro, via colostro (GENOVEZ, 2016).

3.6 Reflexos em Saúde Pública

A leptospirose é uma das zoonoses de origem bacteriana mais prevalente e preocupante em todo mundo (BARTHI, 2003; LEVETT, 2004; GAMAGE et al., 2014), emergente em vários países (PRAJAPATI et al., 2018). A doença é endêmica em países de clima tropical e em desenvolvimento (PICARDEAU, 2013; THIBEAUX et al., 2018), mas também ocorre em países desenvolvidos, particularmente em viajantes (ADUGNA, 2016).

A doença possui risco ocupacional e estima-se que ocorram mais de um milhão de casos clínicos/ano, dos quais 60 mil apresentam evolução fatal (COSTA et al., 2015). A transmissão do patógeno para os humanos ocorre principalmente pelo contato direto de mucosas e conjuntivas com a urina de animais infectados. Esta condição de risco de transmissão ocorre em ambientes recreacionais, coleções de água ou em fazendas, favorecendo a exposição ao agente para plantadores de arroz, canavieiros, mineradores, pescadores, nadadores (GENOVEZ, 2016), criadores, fazendeiros, magarefes, veterinários ou outros profissionais que mantêm contato estreito com animais (MARSHAL e MANKTELOW, 2002).

A maioria dos humanos acometidos (90%) apresentam a forma anictérica, que se manifesta sob a forma de mal-estar geral, mialgias, vômito, dor abdominal e cefaleia, que se assemelha a outras doenças de origem viral, dificultando o diagnóstico inicial. A apresentação clínica mais grave – também conhecida como doença de Weil – desenvolve hemorragias, insuficiência renal e pulmonar, com letalidade entre 5 e 20% dos pacientes (BRASIL, 2005).

O sorodiagnóstico pela técnica de SAM é o principal método indireto utilizado no diagnóstico da doença em humanos (BRASIL, 1995; LEVETT, 2003; BRASIL, 2005), embora as técnicas moleculares representem alternativa para o diagnóstico específico do agente nas últimas décadas (LEVETT et al., 2005). Diante dos primeiros sinais clínicos compatíveis o paciente deve procurar rapidamente o centro médico, informando possíveis antecedentes de contato

ocupacional com animais ou ambientes de risco, como coleções de água (GENOVEZ, 2009).

A prevenção da doença implica em cuidados básicos de higiene, controle de roedores, evitar contato com urina e sangue de animais suspeitos, e evitar coleções e ambientes com água estagnada (ADUGNA, 2016) ou após períodos de enchentes (LEVETT, 2004; GAMAGE et al., 2014).

No Brasil a doença é endêmica e se observa marcante efeito sazonal dos casos em períodos de chuvas e altas temperaturas, particularmente em grandes centros urbanos com problemas de saneamento básico (MACIEL et al., 2008), causados principalmente por sorovares com origem em roedores, como *Icterohaemorrhagiae* e *Copenhageni* (GENOVEZ, 2016), bem como em trabalhadores de propriedades rurais ou que possuem contato direto com animais. Neste contexto, na região de fronteira agrícola da Amazônia oriental (rodovia Transamazônica) foram observados humanos sororreagentes para leptospirose em 97% das propriedades familiares. Nestes núcleos familiares - com pelo menos um indivíduo sororreagente - a prevalência da leptospirose foi de 32,8%, com predomínio dos sorovares Bratislava, Hardjo e Grippotyphosa. Neste mesmo estudo, foram amostrados bovinos criados em contato com os núcleos familiares para o diagnóstico da leptospirose, nos quais o sorovar prevalente foi Hardjo (61,25%), seguido de Bratislava (9%) e Shermani (4,5%) (HOMEM, 2001).

Rende e Ávila (2003) investigaram a leptospirose em 142 amostras de soro humano de trabalhadores rurais, técnicos agropecuários, veterinários e trabalhadores de frigoríficos da região nordeste de São Paulo e do município de Uberaba (MG). Foram identificadas 4,2% (6/142) pessoas reagentes, com títulos que variaram entre 100 e 400 para os sorovares Hardjo, Wolffi e Canícola. No mesmo estudo, em amostras de soros de bovinos leiteiros das mesmas regiões supracitadas, foram encontrados 58,6% (310/529) animais reagentes para um ou mais sorovares de *Leptospira interrogans*.

Em propriedades rurais do município de Pirassununga (SP) foi observada 2,9% (13/445) de prevalência da leptospirose em humanos. O sorovar Patoc (7/12=58,3%) foi o mais frequente, seguido de Pyrogenes (2/12=16,7%), Autumnalis (1/12=8,3%), Bratislava (1/12=8,3%) e *Icterohaemorrhagiae* (1/12=8,3%) (MARTINS, 2005).

Na região de Itaperuna, RJ, 16% (5/32) trabalhadores de propriedades rurais foram sororreagentes para leptospirose, com predomínio dos sorovares Australis (6,25%) e Icterohaemorrhagiae (6,25%) (SILVA, 2007).

Devido à alta prevalência da leptospirose em todo o mundo, faz-se importante desenvolver ações de educação em saúde e testes sorológicos em animais domésticos e humanos contactantes, ocupacionalmente expostos (HOMEM et al., 2001; CALDERÓN et al., 2019), particularmente em áreas endêmicas, visando a profilaxia, o diagnóstico precoce e o tratamento da doença, posto a alta mortalidade em humanos (LEVETT, 2001; GAMAGE et al., 2014; COSTA et al., 2015).

4. LEPTOSPIROSE EM TOUROS

Está bem estabelecido o potencial de transmissão das leptospiros pelo sêmen de animais na monta natural ou utilizando biotécnicas da reprodução como inseminação artificial (ADUGNA, 2016; PRAJAPATI et al., 2018) e transferência de embriões (GENOVEZ, 2016), devido a capacidade do agente de sobreviver às baixas temperaturas de congelamento (EAGLESOME e GARCIA, 1992). No entanto, a maioria dos estudos com a leptospirose bovina em todo o mundo têm sido conduzidos com o sorodiagnóstico em vacas (MGODE et al., 2015; PRAJAPATI et al., 2018; ZARANTONELLI et al., 2018), incluindo no Brasil (HOMEM et al., 2000; JULIANO et al., 2000; CASTRO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009; FIGUEIREDO et al., 2009; HASHIMOTO et al., 2012; HERMANM et al., 2012; MIASHIRO et al., 2018). Com efeito, são restritos os estudos com a doença em touros em todo mundo.

No Brasil, foram encontrados estudos com a leptospirose em touros baseados no diagnóstico do patógeno por isolamento, sorodiagnóstico e/ou PCR (GUIMARÃES et al., 1987; HEINEMMAN et al., 1999, 2000; MAGAJEVSKI et al., 2005; CAMPOS JÚNIOR et al., 2006; GANDA et al., 2016; SÁNCHEZ, 2016); embora em nenhum dos estudos supracitados o resultado da PCR tenha sido confirmado por sequenciamento. Não foram encontrados estudos que investigassem a presença de anticorpos anti-*Leptospira* no sêmen dos touros ou alterações no exame andrológico dos animais reagentes/infectados, que pudessem influenciar na aptidão do sêmen para uso na reprodução.

O sangue e sêmen de 20 touros provenientes de centrais de inseminação do Brasil - sem sinais de problemas do trato reprodutivo - foram submetidos a técnica de SAM (soro) contendo 23 sorovares, enquanto o sêmen foi submetido ao cultivo microbiológico em meio de EMJH e ao PCR convencional. Duas colheitas de soro foram realizadas com intervalo de 30 e 60 dias. O sorovar mais prevalente foi Hardjo na primeira (55%) e na segunda amostragem (25%). Do total de amostras de sêmen, 80% (16/20) foram positivas na PCR. Contudo, nenhuma leptospira foi isolada do sêmen. Ainda, 45% (9/20) das amostras resultaram contaminadas. Os autores confirmaram o predomínio de animais reagentes para o sorovar Hardjo, as dificuldades no isolamento da bactéria no sêmen e a aplicabilidade da PCR no diagnóstico da doença em touros

(HEINEMANN et al., 1999). Partindo deste pressuposto, o mesmo grupo de pesquisadores inoculou, experimentalmente, o sêmen de touros com 26 sorovares de *Leptospira* para determinar o ponto de corte de diagnóstico pela PCR, utilizando enzimas de restrição. Foi observado que a detecção pela técnica de PCR foi possível em amostras de sêmen >100 bactérias/mL (HEINEMANN et al., 2000).

Em 10 touros provenientes de central de inseminação artificial no estado de São Paulo - reagentes na SAM para o sorovar Hardjo - foram colhidas duas amostras de sêmen e urina, com três dias de intervalo. As amostras de urina e sêmen foram submetidas a identificação do patógeno em microscopia de campo escuro, bem como pela técnica de PCR. Ainda, as amostras de sêmen foram inoculadas via intraperitoneal em hamsters (*Mesocricetus auratus*), que foram eutanasiados após 21 dias, para colheita de rins, fígado e sangue. As amostras de sêmen, urina e fragmentos de órgãos dos hamsters foram submetidas ao cultivo de leptospiros no meio semissólido de Fletcher. Em nenhuma amostra de sêmen ou urina foi possível visualizar à microscopia espiroquetas compatíveis com leptospiros. O isolamento microbiano foi negativo nas amostras de sêmen, mas positivo em 50% (5/10) das amostras de urina. Nenhuma amostra de sêmen foi positiva na PCR, enquanto uma amostra de urina foi positiva, simultaneamente, na PCR e no cultivo microbiano. Os autores referiram a dificuldade de isolamento da bactéria em amostras de sêmen - ao contrário da urina - fato que pode estar relacionado a quantidade de unidades formadoras de colônias da bactéria necessárias ao isolamento (MAGAJEVSKI et al., 2005).

Amostras de soro de 140 touros provenientes de 60 propriedades da região de Goiânia, GO, foram submetidas a técnica de SAM. A prevalência de animais reagentes foi de 74,3%, com títulos variando entre 100 e 800, com predomínio dos sorovares Wolffi (19,2%), Hardjo (15,4%), Djasiman e Grippotyphosa (5,7%). Não houve associação entre a soroprevalência e aptidão do rebanho, tampouco com a ocorrência de abortamentos nas fazendas. Os autores concluíram que a doença é preocupante nos rebanhos amostrados e sinalizaram a necessidade de realização de testes sorológicos periódicos e medidas de controle e profilaxia para a leptospirose bovina (CAMPOS JÚNIOR et al., 2006).

A concentração bacteriana de leptospiros necessárias para detecção na PCR no sêmen - experimentalmente infectado - foi avaliada em touros. Para tanto, amostras de sêmen de touros negativos foram contaminadas com sorovar Hardjo em diferentes concentrações. Ainda, a detecção de infecções naturais pelo agente no sêmen, utilizando a PCR, foi realizada em 146 touros em atividade reprodutiva provenientes de monta natural e centrais de inseminação artificial no estado de Minas Gerais. Todos os touros foram submetidos a SAM utilizando 14 sorovares. Os resultados na SAM revelaram que 23,97% (35/146) dos touros reagiram para um ou mais sorovares, com títulos entre 100 e 800, com predomínio de Hardjo (39,06%) e Wolffi (32,81%), seguidos em menores frequências por Hebdomadis (10,93%), Grippotyphosa (4,68%), Australis (3,12%), Atumnalis (3,12%), Bataviae (3,12%), Bratislava (1,56%) e Icterohaemorrhagiae (1,56%). O ponto de corte observado para detecção experimental das leptospiros na PCR foi 10^3 bactérias/mL de sêmen. Nenhuma amostra de sêmen dos touros em atividade reprodutiva foi positiva na PCR. Os autores confirmaram o predomínio de infecções pelo sorovar Hardjo em touros e a provável eliminação intermitente de leptospiros pelo sêmen dos animais, fato que pode dificultar a identificação do agente por este humor orgânico (GANDA et al., 2016).

Amostras de soro de 400 touros reprodutores de centrais de receptoras de embrião e fazendas de cria da região de Bauru, SP, foram submetidos ao sorodiagnóstico pela técnica de SAM diante de vários sorovares. Amostras de sêmen e sangue dos animais foram cultivadas em meio de Fletcher e submetidas a detecção de leptospiros por PCR. Todas as culturas resultaram negativas. A técnica de SAM revelou que 83% dos animais foram reagentes, com predomínio dos sorovares Hardjopravito (71,6%), Hardjo CTG (62,8%), Wolffi (60,1%) e Hardjo (45,6%). Na PCR do sangue foram identificadas 0,7% (3/400) amostras positivas, apesar dos animais acusarem resultados negativos na SAM. Na PCR do sêmen, 8,1% (3/37) dos animais foram positivos. Os autores ressaltaram o predomínio de animais reagentes para sorovares do sorogrupo Sejroe e a detecção, por PCR, de amostras positivas de sangue e sêmen em touros em atividade reprodutiva na região, sugerindo a necessidade de adotar medidas de diagnóstico periódico e de controle da doença (SÁNCHEZ, 2016).

Considerando o impacto da leptospirose como uma das mais preocupantes zoonoses de origem bacteriana, os prejuízos com a doença em bovinos - principalmente na esfera reprodutiva, em países de clima tropical -, o número reduzido de investigações sobre a detecção do agente no sêmen de touros em atividade reprodutiva sob o regime de monta natural, bem como a ausência de estudos sobre a presença de aglutininas anti-*Leptospira* no sêmen e a influência da infecção pelo agente na viabilidade do sêmen; foi desenvolvido o presente estudo com o intuito de investigar a soroprevalência da doença pela técnica de SAM em 203 touros adultos, sem sinais aparentes de inflamação no trato reprodutivo e em atividade reprodutiva de monta natural. Simultaneamente, o sêmen dos touros foi submetido ao exame andrológico, ao diagnóstico molecular pela PCR, sequenciamento e a sêmen plasma aglutinação modificada, substituindo o soro pelo plasma seminal.

5. OBJETIVOS

5.1 Geral

Comparar a performance da SAM, técnicas moleculares (PCR e sequenciamento), sêmen plasma aglutinação modificada e exame andrológico em touros bovinos, em atividade reprodutiva a campo, sem sinais de anormalidades do trato reprodutivo, no diagnóstico da leptospirose.

5.2 Específicos

- ✓ Avaliar as principais alterações na viabilidade do sêmen dos touros a partir do exame andrológico.
- ✓ Investigar os sorovares mais prevalentes de leptospirosas no teste da SAM;
- ✓ Detectar leptospirosas no sêmen utilizando as técnicas de PCR (genes *16S*, *Lep1* e *Lep2*) e/ou sequenciamento;
- ✓ Identificar aglutininas anti-*Leptospira* no sêmen dos touros utilizando a técnica de sêmen plasma aglutinação modificada, substituindo o soro pelo plasma seminal na técnica de SAM;

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Comissão de Ética

O estudo proposto foi aprovado na Câmara de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP, protocolo número 0213/2017.

6.2 Animais e criatórios

Foram utilizados no estudo, por conveniência, 203 touros entre 3 e 12 anos, das raças Nelore, Gir, Angus, Holandês Preto e Branco e mestiços, provenientes da região centro-oeste do estado de São Paulo.

Para a inclusão dos touros foram utilizados os seguintes critérios: (1) não apresentar sinais aparentes de orquite ou inflamação das glândulas acessórias, (2) estar em atividade reprodutiva sob o regime de monta natural (> 36 meses de idade), (3) não ter recebido vacina contra leptospirose nos últimos 12 meses.

Todos os animais amostrados foram criados em condições similares de alimentação, manejo e sanidade.

6.3 Colheita e estoque das amostras de soro sanguíneo e sêmen

As amostras de soro sanguíneo foram colhidas assepticamente dos animais por venopunção jugular utilizando vacutainer® (BD, Curitiba, SP, Brasil). Após a separação do soro, as amostras foram aliquotadas e congeladas (-20°C).

As amostras de sêmen foram colhidas pelo método convencional de eletroejaculação (HAFEZ e HAFEZ, 2004; PALMER, 2005) e analisadas imediatamente quanto a viabilidade espermática (KASTELIC e THUNDATHIL, 2008). Uma alíquota das amostras de sêmen de todos os touros foi congelada (-20°C), visando o diagnóstico por sêmen plasma aglutinação, PCR e sequenciamento. Ambas amostras de sêmen e sangue foram colhidas uma vez de cada animal.

6.4 Exame andrológico

O exame andrológico foi realizado segundo procedimento padrão (HAFEZ e HAFEZ, 2004) adotando formulário padronizado (Anexo 1) contendo informações dos reprodutores, do exame clínico do aparelho reprodutor bovino, das características morfológicas e patologias do sêmen, e a avaliação

reprodutiva do touro (apto ou inapto) (BARBOSA et al., 2005; KASTELIC e THUNDATHIL, 2008). O exame andrológico foi realizado por médicos veterinários especializados na área de reprodução animal.

6.5 Soroaglutinação microscópica com antígenos vivos

Para a identificação dos sorovares foi realizada a técnica de soroaglutinação microscópica com antígenos vivos, conforme o Ministério da Saúde (BRASIL, 1995).

Foram utilizados como antígenos 16 sorovares patogênicos, pertencentes a 11 sorogrupos (Quadro 1), mantidos vivos e repicados semanalmente em meio de EMJH, em temperatura entre 28 e 30°C, da coleção de leptospiros do laboratório de Zoonoses do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP, sob a responsabilidade do Prof. Titular Hélio Langoni.

A técnica foi realizada em duas etapas, divididas em triagem (diluição 1:100) e titulação (1:200 até 1:3.200).

Na etapa de triagem, o soro foi diluído inicialmente em tubos (16x160 mm) na proporção 1:50, que correspondeu a 0,1 mL do soro teste e 4,9 mL (solução A) de solução salina tamponada (SST), pH 7,6. Em seguida foram distribuídos em microplacas de 96 poços, 50 µL da solução A, de acordo com o número de sorovares testados. O mesmo procedimento foi realizado para os controles-negativos (solução de SST, pH 7,6). Posteriormente foi acrescentado em cada poço dos soros testes e controles-negativos, 50 µL de cada um dos antígenos (sorovares) a serem testados (diluição 1:100). As microplacas foram incubadas em estufa entre 28° e 30°C, por duas horas. A leitura foi realizada em microscópio de campo escuro (Axio, Imager A2, Zeiss™, Gottingen, Germany) em aumento de 100x. Foram consideradas reagentes amostras de soro com $\geq 50\%$ de aglutinação de leptospiros.

Na titulação, a partir da diluição 1:50 da triagem, foram realizadas mais seis diluições em dobro (1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1.600 e 1:3.200) em microplacas. Para tanto, 100 µL da solução A foi disposta no primeiro poço para cada soro teste e nos controles e, nos demais poços, foram adicionados 50 µL de SST em pH 7,6. As diluições supracitadas foram obtidas a partir da passagem de 50 µL da primeira para a segunda diluição e, assim, sucessivamente,

homogeneizando, até desprezar 50 µL do último tubo. As microplacas foram incubadas em estufa nas mesmas condições descritas para a triagem. De modo similar à triagem, foram consideradas reagentes amostras de soro com $\geq 50\%$ de aglutinação de leptospiros (FORNAZARI, 2015; SÁNCHEZ, 2016). Ao final do teste, foram considerados animais reagentes com títulos >100 . O teste da SAM foi realizado no Laboratório do Serviço de Diagnóstico de Zoonoses, do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP.

QUADRO 1. Espécies, sorovares, sorogrupos e cepas representativas de leptospiros utilizadas no teste de soroaglutinação microscópica com antígenos vivos. Laboratório de Zoonoses-FMVZ-UNESP/Botucatu, SP. 2017-2019.

Espécie	Sorogrupo	Sorovar	Cepa
<i>L. interrogans</i>	Australis	Bratislava	Jez-Bratislava
<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Castellonis	Castellón
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV
<i>L. interrogans</i>	Djasiman	Djasiman	Djasiman
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moska V
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	M 20
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA
<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona	Pomona
<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Wolffi	3705
<i>L. borgpetersenii</i>	Shermani	Tarassovi	Perepelitsin
<i>L. santarosai</i>	Sejroe	Guaricura	Bov G.
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Hardjobovis	Hardjobovis
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Hardjo CTG	Hardjo CTG
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Mini	Hardjominis
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Hardjoprajitno	Hardjoprajitno

6.6 Sêmen plasma aglutinação modificada

Todas as amostras de sêmen foram submetidas à prova de sêmen plasma aglutinação modificada, padronizada para o diagnóstico da brucelose bovina (NARDI JÚNIOR et al., 2017). Para tanto, o sêmen foi tratado previamente com azida sódica (30 µL de azida sódica a 1% / mL de sêmen). Em seguida, o sêmen foi centrifugado (3.000 rpm/5 minutos) e o plasma seminal utilizado no diagnóstico da SAM (subitem 7.5), em substituição ao mesmo volume de soro sanguíneo (PAULIN, 2003). No entanto, ao contrário da SAM, foram consideradas duas diluições anteriores (1:25 e 1:50) para o diagnóstico de amostras reagentes, perfazendo a investigação de aglutininas anti-*Leptospira*

nas diluições 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1.600 e 1:3.200. A sêmen plasma aglutinação foi realizada nos Laboratórios de Imunodiagnóstico e de Zoonoses do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP.

6.7 Diagnóstico molecular

6.7.1 Extração do material genético:

As amostras foram extraídas por DNAzol™ (Invitrogen, California, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Como controle positivo de cada grupo extraído foi utilizada cultura de *L. interrogans* sorovar Pomona e, a cada seis amostras extraídas, foi adicionado um controle negativo (água ultrapura). Em cada grupo de extração foi utilizado um controle negativo para cada amostra.

6.7.2 Reação de PCR

A triagem das amostras de sêmen foi realizada com a PCR convencional (gene *16S rRNA*) e as reações positivas foram confirmadas pelo sequenciamento.

Brevemente, num volume final de 20 µL, foram adicionados 2,0 µL de DNA, 1x Master Mix™ (Promega, Madison, USA), 1,25mM dos primers direcionados a região *16S rRNA*, e genes *Lep 1* (5'GGCGGCGCGTCTTAAACATG-3') e *Lep2* (3'TTAGAACGAAGTTACCCCCCTT-5'), além de água ultrapura q.s.p., em volume final de 20 µL. As condições de ciclo foram com segue: desnaturação inicial de 94°C por 3 min., seguida por 35 ciclos para anelamento de 94°C por 60seg., 60°C por 60 seg., 72°C por 60 seg. e extensão final de 72°C por 10 min. As reações foram realizadas em termociclador Multigene™ (Labnet International Inc., New Jersey, USA). Os amplicons foram visualizados após corrida eletroforética em gel a 1,5% de agarose corado com SYBR-Safe-Nitrogen™ (ThermoFischer Scientific, Massachusetts, EUA) utilizando 1,0 µL para cada 10 mL de gel de agarose. Foi utilizado marcador de peso molecular de 100pb para comparação com as bandas encontradas. O tamanho esperado do fragmento para as leptospiros foi 330pb.

6.7.3 Sequenciamento

As amostras que apresentaram o tamanho de bandas esperadas na PCR (*16S rRNA*, *Lep 1* e/ou *Lep2*) foram submetidas ao sequenciamento com base no método de Sanger utilizando BigDye 3.1™ (Applied Biosystems, California, USA), de acordo com as instruções do fabricante, utilizando sequenciador automático ABI-3500™ (Applied Biosystems, California, USA). Os cromatogramas gerados para cada uma das sequências senso e anti-senso - de cada amostra - foram submetidos à análise de qualidade no programa Phred/Phrap (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). Foram utilizadas apenas posições com escore superior a 20 (1 erro a cada 100 nucleotídeos). As sequências foram montadas com o auxílio do programa CAP3 (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>) e, em seguida, submetidas ao BLASTn para confirmação de leptospira (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As contagens de animais reagentes foram expressas como percentuais em relação ao total de touros testados. Os títulos sorológicos foram considerados como variáveis não paramétricas e expressos como médias geométricas $\pm$ desvio-padrões geométricos. Para o cálculo das médias geométricas, os títulos com valor “zero” foram substituídos por 1,0 (um), conforme fórmula abaixo (DE LA CRUZ; KREFT, 2018):

$$MG = \exp\left(\frac{1}{n} \sum \log(x_i + 1)\right) - 1$$

As contagens de animais reagentes com títulos ≥ 400 foram comparadas entre sorovares pelo teste Q de Cochran, com contrastes pelo método de Qui-Quadrado de MacNemar. Os títulos sorológicos para cada sorovar foram comparados com o teste de Friedman com contrastes pelo método de Dunn. As análises estatísticas foram conduzidas no software R, considerando-se 5% de nível de significância (R Development Core Team, 2018).

8. RESULTADOS

8.1 Exame andrológico

Do total de touros submetidos ao exame andrológico, 3,94% (8/203) foram considerados inaptos no exame andrológico, apresentando anormalidades de viabilidade do sêmen como necropermia e azoospermia (Tabela 2).

8.2 Sêmen plasma aglutinação modificada

Nenhuma das 203 amostras apresentou aglutininas na sêmen plasma aglutinação modificada (Tabela 2).

8.3 Soroaglutinação microscópica com antígenos vivos

Dos 203 touros amostrados, 65% (132/203) foram reagentes a SAM para pelo menos um sorovar do gênero *Leptospira*, com predomínio dos sorovares Hardjo CTG (100/203=49,3%), Guaricura (72/203=35,5%), Wolffi (74/203=36,4%) e Hardjoprajitno (56/203=27,6%), e menores frequências de Hardjobovis (16/203=7,9%) e Pyrogenes (3/203=1,5%). Nenhum dos animais foi reagente para os sorovares Bratislava, Castellonis, Canicola, Copenhageni, Djasmin, Grippytyphosa, Icterohaemorrhagiae, Mini, Pomona e Tarassovi (Tabela 3).

Na maioria dos animais reagentes foram observados títulos baixos de 100 (93/203=45,8%) e 200 (110/203=54,2%). Os maiores títulos (800, 1.600 e 3.200) foram observados exclusivamente para os sorovares do grupo Sejroe (Hardjo CTG, Hardjoprajitno, Guaricura e Wolffi) (Tabela 3).

TABELA 2. Exame andrológico, sêmen plasma aglutinação (SPA) modificada, soroaglutinação microscópica com antígenos vivos (SAM), reação em cadeia pela polimerase (PCR) e sequenciamento, no diagnóstico da leptospirose no sêmen e soro de 203 touros em atividade reprodutiva em monta natural. Região centro-oeste do estado de São Paulo, 2017-2019.

Método Diagnóstico	Andrológico	SPA modificada	SAM				Métodos Moleculares	
			Sorovares e títulos				PCR (gene 16S rRNA)	Sequenciamento
			Wolffi	Guaricura	Hardjoprajitno	Hardjo CTG		
Animais	Viabilidade do sêmen							
43	necropermia	negativo	200	NR	NR	3.200	negativo	negativo
52	necropermia	negativo	NR	NR	NR	NR	negativo	negativo
64	apto	negativo	NR	NR	400	100	positivo	negativo
84	azoospermia	negativo	200	NR	NR	NR	negativo	negativo
98	azoospermia	negativo	NR	NR	NR	NR	negativo	negativo
110	azoospermia	negativo	NR	NR	NR	NR	negativo	negativo
136	necropermia	negativo	NR	200	400	100	negativo	negativo
157	necropermia	negativo	NR	NR	200	100	negativo	negativo
161	necropermia	negativo	NR	NR	800	400	negativo	negativo
229	apto	negativo	NR	NR	NR	NR	positivo	negativo
772	apto	negativo	NR	NR	NR	NR	positivo	negativo

TABELA 3. Frequência de touros reagentes¹ a diferentes sorovares² de leptospiras diagnosticados pela técnica de soroaglutinação microscópica com antígenos vivos. Região centro-oeste do estado de São Paulo, 2017-2019.

Sorovares	Título sorológico						Total
	100	200	400	800	1.600	3.200	
Guaricura	26	33	10	2	1	0	72/203 (35,5)
Hardjobovis	7	8	1	0	0	0	16/203 (7,9)
Hardjo CTG	29	29	19	13	6	4	100/203 (49,3)
Hardjoprajitno	0	13	33	7	3	0	56/203 (27,6)
Pyrogenes	0	1	2	0	0	0	3/203 (1,5)
Wolffi	31	26	13	4	0	0	74/203 (36,4)
Total	93	110	78	26	10	4	

¹ Título > 100; N = número; % = porcentagem

² Sorovares não reagentes = Bratislava, Castellonis, Canicola, Copenhageni, Djasiman, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Mini, Pomona e Tarassovi

Dentre os oito touros cujo ejaculado foi considerado não viável para a atividade reprodutiva, 62,5% (5/8) foram reagentes exclusivamente para sorovares do sorogupo Sejroe (Wolffi, Guaricura, Hardjoprajitno, Hardjo CTG), com títulos variando entre 100 e 3.200 para pelo menos um sorovar (Tabela 2).

O teste Q de Chochran revelou diferenças estatísticas entre a proporção de touros reagentes na SAM (títulos sorológicos ≥ 400) para seis sorovares do sorogruppo Sejroe e o sêmen considerado apto ($p < 0,0001$). Na Tabela 4 estão sumarizados os resultados das comparações entre sorovares para touros aptos pelo método de Qui-quadrado de MacNemar. Na mesma tabela estão descritos os resultados das comparações das frequências de soropositividade entre touros aptos e inaptos, dentro de cada sorovar.

O teste de MacNemar revelou que os sorovares Hardjoprajitno e Hardjo CTG foram os mais frequentes no semen considerado viável dos touros, seguido pelos sorovares Wolffi e Guaricura. Não foi observada diferença entre sêmen considerado viável e não viável ($p = 0.1136$).

Nos touros aptos, os sorovares Hardjo CTG e Hardjoprajitno apresentaram percentuais de animais sororreagentes estatisticamente iguais, contudo, foram significativamente mais altos que os demais. Os sorovares Wolffi e Guaricura apresentaram percentuais de soropositividade iguais entre si, porém superiores a Hardjobovis e Pyrogenes; estes últimos, apresentaram percentuais de soropositividade estatisticamente iguais, porém mais baixos que os demais.

No teste de Friedman foi observada diferença entre títulos para os sorovares do sorogrupo Sejroe na SAM e sêmen considerado viável ($p < 0,001$) e não viável ($p = 0,046$). O teste de Dunn revelou que os maiores títulos foram observados para os sorovar Hardjo CTG. Não foi observada associação entre os resultados das técnicas moleculares e SAM, SPA e viabilidade do semen.

Tabela 4. Frequência de touros com títulos sorológicos ≥ 400 no teste de soroaglutinação microscópica com antígenos vivos, segundo o sorovar de leptospira e viabilidade do sêmen no exame andrológico. Região centro-oeste do estado de São Paulo, 2017-2019.

Sorovar	Viabilidade do sêmen		p**
	Aptos (N=127)*	Inaptos (N=5)	
Guaricura	16 (12.6%) ^a	0 (0%)	0,8822
Hardjobovis	1 (0.8%) ^b	0 (0%)	1
Hardjo CTG	44 (34.6%) ^c	2 (40%)	1
Hardjoprajitno	41 (32.3%) ^c	2 (40%)	1
Pyrogenes	2 (1.6%) ^b	0 (0%)	1
Wolffi	17 (13.4%) ^a	0 (0%)	0,8447

* Valores seguidos de letras diferentes na coluna indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$); ** Significância estatística para comparação entre frequências de soropositividade entre touros aptos e inaptos pelo teste de Qui-quadrado de Pearson.

Tabela 5. Médias geométricas dos títulos sorológicos e animais sororreagentes no teste de soroaglutinação microscópica com antígenos vivos, segundo diferentes sorovares em 127 touros aptos no exame andrológico. Região centro-oeste do estado de São Paulo, 2017-2019.

Título	Sorovar					
	Wolffi	Guaricura	Hardjoprajitno	Hardjo	Pyrogenes	Hardjo CTG
	55	57	74	111	124	31
NR	(43,3%)	(44%)	(58,3%)	(87,4%)	(97,6%)	(24,4%)
	31	25	0	7	0	28
100	(24,4%)	(19,7%)	(0%)	(5,5%)	(0%)	(22,0%)
	24	32	12	8	1	28
200	(18,9%)	(25,2%)	(9,5%)	(6,3%)	(0,8%)	(22,0%)
	13	10	32	1	2	18
400	(10,2%)	(7,9%)	(25,2%)	(0,8%)	(1,6%)	(14,2%)
	4	2	6	0	0	13
800	(3,1%)	(1,6%)	(4,7%)	(0%)	(0%)	(10,2%)
	0	1	3	0	0	6
1.200	(0%)	(0,8%)	(2,4%)	(0%)	(0%)	(4,7%)
	0	0	0	0	0	3
3.600	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)	(2,4%)
MG*	19.09 a	18.17 ab	12.19 c	1.89 d	1.15 e	70.53 b

NR = não reagente; MG = Média geométrica; * Médias geométricas seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente.

Tabela 6. Médias geométricas dos títulos sorológicos e animais sororreagentes no teste de soroaglutinação microscópica com antígenos vivos, segundo sorovar testado em touros inaptos no exame andrológico. Região centro-oeste do estado de São Paulo, 2017-2019.

Título	Sorovar					
	Wolffi	Guaricura	Hardjoprajitno	Hardjo	Pyrogenes	Hardjo CTG
NR	3 (60%)	2 (40%)	2 (40%)	5 (100%)	5 (100%)	1 (20%)
100	0 (0%)	1 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (20%)
200	2 (40%)	1 (20%)	1 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (20%)
400	0 (0%)	0 (0%)	1 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (20%)
800	0 (0%)	1 (20%)	1 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
1200	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
3600	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (20%)
MG*	8,3 ab	7,2 ab	36,4 b	0 a	0 a	120,7 b

NR = não reagente; MG = Média geométrica; * Médias geométricas seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente.

8.4 Diagnóstico molecular

Na técnica convencional de PCR utilizando marcador molecular *16S rRNA*, 1,5% (3/203) touros foram positivos, embora estas reações positivas não foram confirmadas pelo sequenciamento (Tabela 2).

9. DISCUSSÃO

A performance do diagnóstico sorológico e molecular da leptospirose no soro e sêmen de 203 touros em atividade reprodutiva em regime de monta natural - sem sinais aparentes de inflamação do trato reprodutivo - foi avaliada no presente estudo revelando prevalência de animais reagentes para sorovares do grupo Sejroe e detecção de três (1,5%) animais positivos na *PCR 16S rRNA* do sêmen, que não foram confirmados pelo sequenciamento. Apesar da baixa relação entre o diagnóstico sorológico e molecular, a alta frequência de aglutininas anti-*Leptospira* nos touros amostrados indica a necessidade de realização de diagnóstico periódico e adoção de ações de profilaxia/controle para evitar os prejuízos com falhas reprodutivas e os riscos em saúde pública representados pela leptospirose bovina. Ademais foi investigada, pela primeira vez, a produção de aglutininas anti-*Leptospira* no ejaculado de touros utilizando técnica modificada de sêmen plasma aglutinação, a relação entre animais reagentes na SAM e anormalidades na viabilidade do sêmen no exame andrológico, bem como o sequenciamento como técnica confirmatória de touros positivos no sêmen na PCR convencional.

O isolamento microbiano ainda é considerado “padrão ouro” no diagnóstico direto da leptospirose em animais. No entanto, as leptospirosas são exigentes quanto aos requerimentos para o isolamento (QUINN et al., 2011) e eliminadas de modo intermitente nos humores orgânicos dos animais infectados (JANWITTHAYANAN et al., 2013; ADLER, 2014; ADUGNA, 2016; GENOVEZ et al., 2016; GANDA et al., 2016). Digno de nota, também, que existem riscos de contaminação das amostras na colheita de material (MAGAJEVSKI et al., 2005), bem como dos operadores em nível laboratorial, fato que restringe o cultivo microbiano do patógeno a laboratórios que detém pessoal treinado e atendem às rigorosas condições de biossegurança (SUMAN e KHALID, 2014).

Particularmente no que tange ao cultivo microbiológico de leptospirosas no ejaculado de touros, não se tem obtido sucesso no isolamento do patógeno a partir do sêmen (HEINEMANN et al., 1999; MAGAJEVSKI et al., 2005; GANDA et al., 2016) e do sangue (SANCHÉZ, 2016), apesar do isolamento da urina (MAGAJEVSKI et al., 2005). O insucesso no isolamento tem sido atribuído à eliminação intermitente do patógeno pelo sêmen (GANDA et al., 2016), a

possibilidade de contaminação das amostras com bactérias convencionais ou oportunistas (MAGAJEVSKI et al., 2005), ao número mínimo necessário de leptospiros viáveis/mL no sêmen (HEINEMANN et al., 2000; GANDA et al., 2016), assim como as exigências nas condições laboratoriais para o isolamento (HEINEMANN et al., 1999; MAGAJEVSKI et al., 2005; SUMAN e KHALID, 2014). Com efeito, em virtude da inconsistência do procedimento, o isolamento microbiano não foi realizado nos touros amostrados, o que pode ser considerada uma limitação do presente estudo.

As principais causas de baixa fertilidade ou de infertilidade em touros criados no Brasil são degeneração testicular, maturidade sexual retardada, hipoplasia testicular, espermiogênese imperfeita e imaturidade sexual (BARBOSA, 2005). Estima-se que entre 20 e 40% dos touros bovinos em idade reprodutiva possam apresentar anormalidades na viabilidade espermática, atribuídas a diferentes causas, incluindo de origem infecciosa (KASTELIC e THUNDATHIL, 2008).

Com base no exame andrológico podem ser identificadas alterações no desenvolvimento do sistema genital, anomalias regressivas, patologias progressivas e alterações inflamatórias, oriundas ou não de doenças infectocontagiosas nos diferentes órgãos, bem como distúrbios na libido e na habilidade de cópula (HAFEZ e HAFEZ, 2004). Essas alterações determinam incapacidade de fertilização, em graus variáveis, resultando em sub ou infertilidade nos machos dos plantéis (BARBOSA et al., 2005; KASTELIC e THUNDATHIL, 2008).

No presente estudo, 3,5% (8/203) dos touros foram considerados inaptos no exame andrológico, apresentando anormalidades como necropermia e azoospermia, que inviabilizam o uso do sêmen na reprodução. Destes, somente três touros (nº 43, 136 e 161) apresentaram títulos considerados altos na SAM (≥ 400) para sorovares do grupo Sejroe (Hardjo CTG, Hardjoprajitno) (Tabela 2), embora nenhum destes animais tenha resultado positivo na PCR 16S rRNA. No entanto, seria de se esperar que touros com títulos elevados na soroaglutinação apresentassem a eliminação de leptospiros pelo sêmen *in natura* (MUGHINI-GRAS et al., 2014). Tal discordância ou a baixa relação entre a sorologia e a PCR tem sido observada em estudos similares e creditada a eliminação intermitente da bactéria pelo ejaculado, mesmo em touros infectados no trato

genital masculino (MAGAJEVSKI et al., 2005; GANDA et al., 2016); fato que poderia ser contornado com colheitas sucessivas de sêmen, do mesmo animal, visando o diagnóstico da doença, utilizando a combinação de técnicas diagnósticas.

A sêmen plasma aglutinação é um teste padronizado para o diagnóstico da brucelose bovina, que se fundamenta no uso do plasma seminal em substituição ao soro, em testes sorológicos convencionais. Esta técnica identifica Ig das classes IgM e IgA (CASAS OLASCOAGA, 1976; PAULIN, 2003). Tal técnica é válida no diagnóstico da brucelose em touros, posto à predileção de *Brucella abortus* pelo trato reprodutivo do macho, particularmente das glândulas acessórias (MEGID e MATHIAS, 2016). Assim, muitos animais podem apresentar baixos títulos ou ausência de títulos séricos, ainda que estejam infectados e eliminando brucelas pelo sêmen (VASCONCELLOS et al., 1987; NARDI JÚNIOR et al., 2017). Neste contexto, a performance do exame andrológico, isolamento microbiano, testes sorológicos, sêmen plasma aglutinação e PCR no diagnóstico da brucelose em 335 amostras de sêmen de touros do estado de São Paulo revelou positividade em 1,5% (5/335) destes animais na sêmen plasma aglutinação, testes sorológicos convencionais, isolamento microbiano e PCR, ainda que o exame andrológico tenha acusado animais aptos a reprodução. No mesmo estudo, 0,6% (2/335) resultaram negativos em todos os testes (incluindo sorológicos) e positivos somente na PCR, alertando para o risco de eliminação do agente em animais considerados aptos a reprodução pelos testes convencionais, bem como a necessidade de associação de métodos para melhorar a acurácia diagnóstica da doença em touros (NARDI JÚNIOR et al., 2017).

No presente estudo, tal hipótese de produção de Ig anti-*Leptospira* no sêmen de touros foi investigada pela primeira vez. Entretanto, apesar do teste modificado de sêmen plasma aglutinação nos animais amostrados ter sido realizado com diluições inferiores (1:25 e 1:50) a preconizada para a SAM, não foi identificada a presença de aglutininas anti-*Leptospira*, indicando que - ao contrário da brucelose - a infecção pelo patógeno não está restrita ao trato genital nos touros.

Sorovares do grupo Sejroe têm predominado nos estudos sorológicos da leptospirose em bovinos. No entanto, grande variação na soroprevalência da

leptospirose tem sido observada em vacas e em touros (LANNES et al., 2016; LUCCHESE et al., 2016; CONSTABLE et al., 2016; ADUGNA, 2016; PRAJAPATI et al., 2018; ZARANTONELLI et al., 2018). No Brasil, os estudos com a soroprevalência da leptospirose bovina têm sido conduzidos majoritariamente com vacas revelando variação entre 38 e 97% de animais reagentes - a pelo menos um sorovar - e o predomínio do sorogrupo Sejroe, apesar da identificação de sorovares de outros grupos, e.g., Grippotyphosa, Shermani, Icterohaemorrhagiae, Bratislava, Pyrogenes, Pomona e Djasmin (HOMEM et al., 2000; LANGONI et al., 2000; JULIANO et al., 2000; CAMPOS JÚNIOR et al., 2006; CASTRO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009; FIGUEIREDO et al., 2009; HASHIMOTO et al., 2012; HERMANM et al., 2012; MIASHIRO et al., 2018).

Tal diversidade pode ser atribuída às diferentes condições edafoclimáticas, coabitação de bovinos com outras espécies domésticas e silvestres/selvagens (PETRAKOVSKY et al., 2014; MARTINS e LILENBAUM, 2017; CORREIA et al., 2017), fluxo de animais, manejo geral e sistema de reprodução dos animais (e.g., monta natural, inseminação artificial e transferência de embriões) (ADUGNA, 2016; PRAJAPATI et al., 2018), além da adoção de profilaxia vacinal (BONDURANT, 2005; KOIZUMI e WATANABE, 2005; ADLER, 2015), que podem influenciar na exposição dos animais à infecção por diferentes genoespécies e sorovares do gênero *Leptospira*. Ainda que a avaliação de tais fatores de risco não tenha sido objeto do presente estudo, a elevada soroprevalência (65%) encontrada nos touros amostrados, particularmente para sorovares do sorogrupo Sejroe - como Hardjo CTG, Wolffi, Guaricura e Hardjoprajitno - indica a necessidade de sorodiagnóstico periódico de animais utilizados para reprodução. Posto que é conhecido que os bovinos são hospedeiros de manutenção (adaptados) de leptospirosas nas fazendas, notadamente para sorovares do sorogrupo Sejroe (CONSTABLE et al., 2016), medidas de profilaxia/controle da doença visando evitar a transmissão entre bovinos são recomendadas, incluindo à adoção de vacinação, quarentena para animais recém-adquiridos, isolamento e tratamento de animais infectados (ADUGNA, 2016; MARTINS e LILENBAUM, 2017; PRAJAPATI et al., 2018).

No presente estudo, houve diferença significativa entre títulos sorológicos para diferentes sorovares em touros aptos ($p < 0,001$) e inaptos ($p = 0,046$). Em contraste, a frequência de touros reagentes - para cada sorovar - não diferiu

entre touros aptos e inaptos, sugerindo que a soroprevalência a um determinado sorovar não está associada a aptidão para a reprodução, embora o pequeno número de touros no grupo inapto (oito animais) pode ter reduzido o poder do teste estatístico.

Os estudos com a soroprevalência da leptospirose em touros têm sido conduzidos principalmente em animais alojados em Centros de Coleta e Processamento de Sêmen (CCPS) (HEINEMANN et al., 1999; MAGAJEVSKI et al., 2005), popularmente conhecidos no Brasil como centrais de inseminação artificial, cujos cuidados com a saúde dos reprodutores são rigorosos, e devem atender à legislação específica no tocante ao diagnóstico de enfermidades nos animais e de patógenos nas partidas de sêmen (BRASIL, 2003). Em contraste, no presente estudo foram avaliados touros em regime de monta natural cujos cuidados sanitários, por vezes, podem estar aquém da legislação dos CCPS, ou mesmo negligenciados, favorecendo os riscos de transmissão de patógenos pelo sêmen por estes reprodutores, incluindo por leptospirosas.

Nas últimas décadas, o avanço do diagnóstico molecular possibilitou a reclassificação taxonômica das leptospirosas, a identificação de genoespécies e o diagnóstico do patógeno em diferentes humores orgânicos e tecidos/órgãos, incluindo em amostras nas quais o agente não está mais viável (ELLIS, 2015; ZARANTONELLI et al., 2018; THIBEAUX et al., 2018).

Particularmente no diagnóstico de infecções por leptospirosas no sêmen de touros, os resultados do diagnóstico molecular têm sido controversos, revelando tanto a detecção (HEINEMANN et al., 1999; SANCHÉZ, 2016) quanto o insucesso na identificação do patógeno utilizando exclusivamente a PCR convencional (MAGAJEVSKI et al., 2005; GANDA et al., 2016). As dificuldades na detecção de leptospirosas pela PCR têm sido atribuídas à quantidade mínima necessária de bactérias viáveis/mL no sêmen (HEINEMANN et al., 1999, 2000; GANDA et al., 2016), a eliminação intermitente do patógeno pelo sêmen e a presença de inibidores no ejaculado que podem impedir a extração do material genético bacteriano (ELLIS, 2015; GANDA et al., 2016).

No presente estudo, o sêmen de três (1,5%) touros foram positivos na PCR convencional com o gene *16S rRNA* (triagem), que resultaram negativos na confirmação pelo sequenciamento. Esta discrepância de resultados entre

estas técnicas moleculares pode ser atribuída a maior especificidade do sequenciamento, em detrimento da PCR convencional com o gene *16S rRNA*.

A leptospirose humana foi estimada em um milhão de casos/ano em todo o mundo, dos quais cerca de 60 mil evoluem para óbito, principalmente em populações localizadas em ambientes rurais e suburbanos de países tropicais e subtropicais, incluindo o Brasil (COSTA et al., 2015). Animais de produção (e.g., bovinos), de companhia e silvestres/selvagens, servem como reservatórios de sorovares e genoespécies do patógeno que são eliminados pela urina para o meio ambiente, expondo a infecção de humanos pelo contato direto com os animais, ou mesmo com água e solo contaminados (THIBEAUX et al., 2018), incluindo veterinários, magarefes, agricultores, fazendeiros e laboratoristas (COSTA et al., 2015; ELLIS, 2015). Com efeito, estudos utilizando a combinação de métodos de diagnóstico (microbiológicos, sorológicos e/ou moleculares) são fundamentais para o entendimento da virulência e distribuição geográfica dos diferentes sorovares e genoespécies de leptospira, visando contribuir com o conhecimento de aspectos da epidemiologia da doença, que possam subsidiar ações de profilaxia e controle da leptospirose em animais e em humanos.

10. CONCLUSÕES

- ✓ A maior frequência de touros reagentes para os sorovares Hardjo CTG, Wolffi, Guaricura e Hardjoprajitno reforça o predomínio de infecções em touros por leptospiros do sorogrupo Sejroe, adaptadas à espécie bovina;
- ✓ A ausência de aglutininas anti-*Leptospira* no teste modificado de sêmen plasma aglutinação - em touros com alta soroprevalência na SAM - indica que a infecção pelo patógeno provavelmente não está restrita ao trato genital e, portanto, a sêmen plasma aglutinação não é indicada para o diagnóstico da leptospirose em touros, devido, provavelmente, a baixa ou ausente produção de IgA.
- ✓ Na PCR convencional com o gene *16S rRNA*, 1,5% (3/203) das amostras de sêmen dos touros acusaram reações positivas, que não foram confirmadas no sequenciamento, revelando a importância da combinação de técnicas - incluindo de elevada especificidade - no diagnóstico da leptospirose em touros;
- ✓ A elevada prevalência (65%) de touros reagentes na SAM sinaliza para a necessidade de realização periódica de diagnóstico da doença em touros destinados à reprodução e a adoção de ações de profilaxia/controle visando evitar prejuízos na esfera reprodutiva e os riscos em Saúde Pública representados pela leptospirose bovina.

11. REFERÊNCIAS*

ADLER, B. Pathogenesis of leptospirosis: cellular and molecular aspects. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 172, n. 3, p. 353-358, 2014.

ADLER, B. Vaccines against leptospirosis: cellular and molecular aspects. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 140, n. 3, p. 287-296, 2010.

ADUGNA, S. A review of leptospirosis. **European Journal of Applied Sciences**, Dubai, v. 8, n. 6, p. 347-355, 2016.

AHMAD, S. N.; SHAH, S. Laboratory diagnosis of leptospirosis. **Journal of Postgraduate Medicine**, Mumbai, v. 51, n. 3, p.195-200, 2005.

ALT, D. P.; ZUERNER, R. J.; BOLIN, C. A. Evaluation of antibiotics for treatment of cattle infected with *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 219, p. 636-639, 2001.

BARBOSA, R. T.; MACHADO, R.; BERGAMASCHI, M. A. C. M. A importância do exame andrológico em bovinos. **Circular Técnica**, São Carlos, SP, p.1-13, 2005.

BARTHI, A. R.; NALLY, J. E.; RICARDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; LEVETT, P. N.; GILMAN, R. H.; WILLIG, M. R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 3, n. 12, p. 757-771, 2003.

BONDURANT, R. H. Venereal diseases of cattle: natural history, diagnosis, and the role of vaccines in their control. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 21, n. 2, p. 383-408, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 48, de 17 de junho de 2003. **Requisitos sanitários mínimos para a produção e comercialização de sêmen bovino e bubalino no país**. Diário oficial da União: 20 de junho de 2003. Seção 1:6-7.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. **Manual de Leptospirose**. 2. ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1995. 98 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 6. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005b. 816 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BRASIL. Ministério de Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de leptospirose**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, 1995. 98 p.

CALDERÓN, J. C.; ASTUDILLO, A.; ROMERO, M. H. Caracterización epidemiológica de la infección por *Leptospira* spp. en caballos de trabajo y en personas ocupacionalmente expuestas en seis unidades de la Policía Nacional de Colombia. **Biomédica**, Bogotá, v. 39, supl., p. 19-34, 2019.

CAMPOS JUNIOR, A. C. P.; FRENEAU, G. E.; JULIANO, R. S.; ACYPRESTE, C. S.; DIAS FILHO, F. C.; MARTINS, M. E. Prevalência de anticorpos anti-leptospira em machos bovinos na microrregião de Goiânia. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 7, n. 4, p. 439-446, 2006.

CASAS OLASCOAGA, R. Diagnóstico serológico de la brucelosis. **Zoonosis**, Buenos Aires, v.18, p. 107-141, 1976.

CASTRO, V. **Estudo da soroprevalência da leptospirose bovina em fêmeas em idade reprodutiva no estado de São Paulo, Brasil**. 2007. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

CERQUEIRA, G. M.; PICARDEAU, M. A century of *Leptospira* strain typing. Infection, Genetics and Evolution. **Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, Amsterdam, v. 9, n. 5, p. 760-768, 2009.

CONSTABLE, P. D.; HINCHLIFF, K. W.; DONE, S.; GRUENBERG, W. **Veterinary medicine**: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats. 11. ed. Philadelphia: Saunders, 2016. v. 2, 278 p.

CORREIA, L.; LOUREIRO, A. P.; LILENBAUM, W. Effects of rainfall on incidental and host-maintained *Leptospira* infections in cattle in a tropical region. **Veterinary Journal**, London, v. 220, p. 63-64, 2017.

COSTA, F.; HAGAN, J. E.; CALCAGNO, J.; KANE, M.; TORGERSON, P.; MARTINEZ-SILVEIRA, M. S. Global morbidity and mortality of leptospirosis: a systematic review. **PLoS Neglected Infectious Diseases**, San Francisco, v. 9, n. 9, p. e0003898, 2015.

COSTA, M. C. R.; MOREIRA, E. C.; LEITE, R. C.; MARTINS, N. R. S. Avaliação da imunidade cruzada entre *Leptospira* Hardjo e *L. Wolffi*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 50, p.11-17, 1998.

CULLEN, P. A.; HAAKE, D. A.; ADLER, B. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 28, n. 3, p. 291-318, 2004.

DE LA CRUZ, R.; KREFT, J. U. Geometric mean extension for data sets with zeros. **ArXiv e-prints**, Ithaca, abr. 2019. Disponível em: <https://arxiv.org/abs/1806.06403>. Acesso em: 27 maio 2019.

EAGLESOME, M. D.; GARCIA, M. M. Microbial agents associated with bovine genital tract infections and semen. Part 1. *Brucella abortus*, *Leptospira*, *Campylobacter fetus* and *Trichomonas foetus*. **Veterinary Bulletin**, Farnham Roy, v. 62, p. 743-775, 1992.

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

EVANGELISTA, K. V.; COBURN, J. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. **Future Microbiology**, London, v. 5, n. 9, p. 1413-1425, 2010.

FAVERO, J. F.; ARAUJO, H. L.; LILENBAUM, W.; MACHADO, G.; TONIN, A. A.; BALDISSERA, M. D.; STEFANI, L. M.; SILVA, A. D. Bovine leptospirosis: Prevalence, associated risk factors for infection and their cause-effect relation. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 107, p.149-154, 2017.

FIGUEIREDO, A. O.; PELLEGRIN, A. O.; GONÇALVES, V. S. P.; FREITAS, E. B.; MONTEIRO, L. A. R. C.; OLIVEIRA, J. M.; OSÓRIO, A. L. A. R. Prevalência e fatores de risco para a leptospirose em bovinos de Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 5, p. 375-381, 2009.

FORNAZARI, F. **Epidemiologia da leptospirose em mamíferos silvestres de vida livre da região de Botucatu, SP**. 2015. 60 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2015.

GAMAGE, C. D.; KOIZUMI, N.; PERERA, A. K.; MUTO, M.; NWAFOR-OKOLI, C.; RANASINGHE, S.; KULARATINE, S. A.; RAJAPAKSE, R. P.; KANDA, K.; LEE, R. B.; OBAYASHI, Y.; OHNISHI, M.; TAMASHIRO, H. Carrier status of leptospirosis among cattle in Sri Lanka: a zoonotic threat to public health. **Transboundary and Emerging Diseases**, Berlin, v. 61, n. 1, p. 91-96, 2014.

GANDA, M. R.; SOUZA, M. P. S.; LOURENCETTI, M. P. S.; CIUFFA, A. Z.; SOARES, P. M.; MOREIRA, R. Q.; LIMA, A. M. C. Molecular detection of *Leptospira* spp. in bull semen. **Revue de Médecine Vétérinaire**, Toulouse, v. 167, p. 297-301, 2016.

GENOVEZ, M. E. Leptospirose em animais de produção. In: MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. **Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia**. Rio de Janeiro: Roca, 2016. p. 378-387.

GENOVEZ, M. E. Leptospirose: uma doença de ocorrência além da época das chuvas! **O Biológico**, São Paulo, v. 71, n. 1, p. 1-3, 2009.

GIGUÈRE, S.; BAGGOT, J. D.; WALKER, R. D.; PRESCOTT, J. E.; DOWLING, P. M. **Terapia antimicrobiana em medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2010. 683 p.

GUIMARÃES, M. C.; SANTA ROSA, C. A.; VASCONCELLOS, S. A.; OLVEIRA, J. E. A. S.; CÔRTEZ, J. A. Diagnóstico de leptospirose em bovinos doadores de sêmen. Pesquisa de aglutinas séricas e tentativa de isolamento do agente a partir de amostras de sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, p.136-140, 1987.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 8. ed. São Paulo: Manole, 2004. 583 p.

HASHIMOTO, V. Y.; DIAS, J. A.; SPOHR, K. A. H.; SILVA, M. C. P.; ANDRADE, M. G. B.; MÜLLER, E. E.; FREITAS, J. C. Prevalência e fatores de risco associados à *Leptospira* spp. em rebanhos bovinos da região centro-sul do estado do Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 2, p. 99-105, 2012.

HEINEMANN, M. B.; GARCIA, J. F.; NUNES, C. M.; GREGORI, F.; HIGA, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; RICHTZENHAIN, L. J. Detection and differentiation of *Leptospira* spp. serovars in bovine semen by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 73, n. 4, p. 261-267, 2000.

HEINEMANN, M. B.; GARCIA, J. F.; NUNES, C. M.; MORAIS, Z. M.; GREGORI, F.; CORTEZ, A.; VASCONCELLOS, S. A.; VISINTIN, J. A.; RICHTZENHAIN, L. J. Detection of leptospires in bovine semen by polymerase chain reaction. **Australian Veterinary Journal**, Australia, v. 77, n. 1, p. 32-34, 1999.

HERRMANN, G. P.; RODRIGUES, R. O.; MACHADO, G.; LAGE, A.; MOREIRA, E.; LEITE, R. Soroprevalência de leptospirose em bovinos nas mesorregiões sudeste e sudoeste do estado Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 13, n. 1, p. 131-138, 2012.

HOMEM, V. S. F.; HEINEMANN, M. B.; MORAES, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S. Estudo epidemiológico da leptospirose bovina e humana na Amazônia oriental brasileira. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 34, n. 2, p. 173-180, 2001.

HOMEM, V. S. F.; HEINEMANN, M. B.; MORAES, Z. M.; VIANNA, M. C. B.; SILVA, J. C. R.; SAKAMOTO, S. M.; PINHEIRO, S. R.; VEIGA, J. B.; LAU, H. D.; QUANZ, D.; TOURRAND, J. F.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S. Leptospirose bovina em Uruará, município da Amazônia oriental. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 67, n. 1, p. 1-10, 2000.

JANWITTHAYANAN, W.; EELAWAT, S.; PAYUNGORN, S.; LOWANITCHAPAT, A.; SUWANCHAROEN, D.; POOVORAWAN, Y.; CHIRATHAWORN, C. *In vivo* gene expression and immunoreactivity of *Leptospira* collagenase. **Microbiological Research**, Jena, v. 168, n. 5, p. 268-272, 2013.

JULIANO, R. S.; CHAVES, N. S. T.; SANTOS, C. A.; RAMOS, L. S.; SANTOS, H. Q.; MEIRELES, L. R.; GOTTSCHALK, S.; CORRÊA FILHO, R. A. C. Prevalência e aspectos epidemiológicos da leptospirose bovina em rebanho leiteiro na microrregião de Goiânia – GO. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 5, p. 857-862, 2000.

KASTELIC, J. P.; THUNDATHIL, J. C. Breeding soundness evaluation and semen analysis for predicting bull fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 43, p. 368-373, 2008.

KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospirosis vaccines: past, present, and future. **Journal of Postgraduate Medicine**, Bombay, v. 51, n. 3, p. 210, 2005.

LANGONI, H.; MEIRELES, L. R.; GOTTSCHALK, S.; CABRAL, K. G.; SILVA, A. V. Perfil sorológico da leptospirose bovina em regiões do estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 67, n.1, p. 37-41, 2000.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 14, n. 2, p. 296-326, 2001.

LEVETT, P. N. Leptospirosis: a forgotten zoonosis? **Clinical and Applied Immunology Reviews**, New York, v. 4, n. 6, p. 435-448, 2004.

LEVETT, P. N. Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 36, n. 4, p. 447-452, 2003.

LEVETT, P. N.; MOREY, R. E.; GALLOWAY, R. L.; TURNER, D. E.; STEIGERWALT, A. G.; MAYER, L. W. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 54, n. 1, p. 45-49, 2005.

LILENBAUM, W.; MARTINS, G. Leptospirosis in cattle: a challenge scenario for the understanding of the epidemiology. **Transboundary and Emerging Diseases**, Berlin, v. 61, n. 1, p. 63-68, 2014.

LLANES, A.; RESTREPO, C. M.; RAJEEV, S. [Whole genome sequencing allows better understanding of the evolutionary history of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo](#). **PLoS One**, San Francisco, v. 11, n. 7, p. e0159387, 2016.

LOUREIRO, A. P.; HAMOND, C.; PINTO, P.; BREMONT, S.; BOURHY, P.; LILENBAUM, W. Molecular analysis of leptospires from serogroup Sejroe obtained from asymptomatic cattle in Rio de Janeiro – Brazil reveals genetic proximity to serovar Guaricura. **Research in Veterinary Science**, London, v. 105, p. 248-253, 2016.

LUCCHESI, L.; BENKIRANE, A.; HAKIMI, I.; EL IDRISSE, A.; NATALE, A. Seroprevalence study of the main causes of abortion in dairy cattle in Morocco. **Veterinaria Italiana**, Teramo, v. 52, p. 13-19, 2016.

MACIEL, E. A. P.; DE CARVALHO, A. L. F.; NASCIMENTO, S. F.; DE MATOS, R. B.; GOUVEIA, E. L.; REIS, M. G.; KO, A. I. Household transmission of *Leptospira* infection in urban slum communities. **PloS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 2, n. 1, p. 154, 2008.

MAGAJEVSKI, F. S.; GIRIO, R. J. S.; MATHIAS, L. A.; MYASHIRO, S.; GENOVEZ, M. E.; SCARCELLI, E. P. Detection of *Leptospira* spp. in the semen e urine of bulls serologically reactive to *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 36, p. 43-47, 2006.

MARSHAL, R. B.; MANKTELOW, B. W. Fifty years of leptospirosis research in New Zeland. A perspective. **New Zeland Veterinary Journal**, Wellington, v. 50, p. 61-61, 2002.

MARTINS, G.; LILENBAUM, W. Control of bovine leptospirosis: Aspects for consideration in a tropical environment. **Research in Veterinary Science**, London, v. 112, p. 156-160, 2017.

MARTINS, L. S. **Situação epidemiológica de leptospirose bovina, canina e humana na área rural do município de Pirassununga, SP**. 2005. 79 f Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

MEGID, J.; MATHIAS, L. E. Brucelose. *In*: MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. **Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia**. Rio de Janeiro: Roca, 2016. p. 21-55.

MERIEN, F.; AMOURIAUX, P.; PEROLAT, P.; BARANTON, G.; SANINT-GIRONS, T. Polymerase chain reaction goes detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 30, n. 9, p. 2219-2224, 1992.

MGOODE, G. F.; MACHANG'U, R. S.; MHAMPHI, G. G.; KATAKWEBWA, A.; MULUNGU, L. S.; DURNEZ, L.; LEIRS, H.; HARTSKEERL, R. A.; BELMAIN, S. R. *Leptospira* serovars for diagnosis of leptospirosis in humans and animals in humans and animals in Africa: common *Leptospira* isolates and reservoir hosts. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 9, n. 12, p. e0004251, 2015.

MIASHIRO, A. L.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z. M.; SOUZA, G. O.; LEAL FILHO, J. M.; FIGUEIREDO, A. O.; PELLEGRIN, A. O. Prevalência de leptospirose em rebanhos bovinos no Pantanal de Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 1, p. 41-47, 2018.

MILLAN, J.; CANDELA, M. G.; LOPEZ-BAO, J. V.; PEREIRA, M.; JIMENEZ, M. A.; LEON-VIZCAINO, L. Leptospirosis in wild and domestic carnivores in natural áreas in Andalusia, Spain. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, Larchmont, v. 9, n. 5, p. 549-554, 2008.

MIRAGLIA, F.; MATSUO, M.; MORAIS, Z. M.; DELLAGOSTIN, O. A.; SEIXAS, F. K.; FREITAS, J. C.; HARTSKEERL, T.; MORENO, L. Z.; COSTA, B. L.; SOUZA, G. O.; VASCONCELLOS, S. A.; MORENO, A. M. Molecular characterization, serotyping, and antibiotic susceptibility profile of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni isolates from Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, New York, v. 77, n. 3, p. 195-199, 2013.

MUGHINI-GRAS, L.; BONFANTI, L.; NATALE, A.; COMIN, A.; FERRONATO, A.; LA GRECA, E.; PATREGNANI, T.; LUCCHESI, L.; MARAGON, S. Application of an integrated outbreak management plan for the control of leptospirosis in dairy cattle herds. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 142, p. 1172-1181, 2014.

NARDI JÚNIOR, G.; MEGID, J.; MATHIAS, L. E.; PAULIN, L.; VICENTE, A. F.; CORTEZ, A.; LISTONI, F. J. P.; LARA, G. H. B.; MOTTA, R. G.; CHACUR, M. G. M.; MONTEIRO, F. M.; RIBEIRO, M. G. Performance of microbiological, serological, molecular, and modified seminal plasma methods in the diagnosis of *Brucella abortus* in semen and serum of bovine bulls. **Biologicals**, London, v. 48, p. 6-9, 2017.

OLIVEIRA, F. C. S.; AZEVEDO, S. S.; PINHEIRO, S. R.; VIEGAS, S. A. R. A.; BATISTA, C. S. A.; COELHO, C. P.; MORAES, Z. M.; SOUZA, G. O.; GONÇALVES, A. P.; ALMEIDA, C. A. S.; VASCONCELLOS, S. A. Soroprevalência de leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no estado da Bahia. **Arquivos Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 4, p. 539-546, 2009.

PAES, A. C. Leptospirose canina. *In*: MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C.; **Doenças Infecciosas em Animais de Produção e de Companhia**. Rio de Janeiro: Roca, 2016. p. 356-377.

PALMER, C. W. Welfare aspects of theriogenology: investigating alternatives to eletroejaculation of bulls. **Theriogenology**, Stoneham, v. 64, p. 469-479, 2005.

PATEL, J. M.; PRASAD, M. C.; VIHOL, P. D.; KALYANI, H.; PRAJAPATI, M. G.; PARMAR, H. C.; VARIA, R. D.; PATEL, K. M. Seroprevalence of *Leptospira* Hardjo in cattle of Gujarat, India. **International Journal of Current Microbiology Applied Sciences**, India, v. 6, p. 1304-1310, 2016.

PAULIN, L. M. S. Brucelose. **Arquivos Instituto Biológico**, São Paulo, v. 70, p. 239-249, 2003.

PETRAKOVSKY, J.; BIANCHI, A.; FISUN, H.; NAJERA-AGUILAR, P.; PEREIRA, M. M. Animal leptospirosis in Latin America and the Caribbean: reported outbreaks and literature review (2002-2014). **International Journal Environmental Research and Public Health**, Basel, v. 11, p. 10770-10789, 2014.

PICARDEAU, M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. **Medicine et Maladies Infectieuses**, Paris, v. 43, n. 1, p. 1-9, 2013.

PINTO, P. S.; LIBONAT, H.; PENNA, B.; LILENBAUM, W. A systematic review on the microscopic agglutination test seroepidemiology of bovine leptospirosis in Latin America. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 48, p. 239-248, 2016.

PRAJAPATI, A.; KUSHWAHA, A.; CHAYANIKA, D.; SUBHASHREE, N.; VARSHA, P.; MARCIA, A.; LAHARI, L.; SHIVASHANKAR, P.; PATEL, N. A review on bovine leptospirosis with special reference to seroprevalence in India. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, India, v. 7, n. 4, p. 1813-1820, 2018.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; LEONARD, F. C.; FITZPATRICK, E. S.; FANNING, S.; HARTIGAN P. J. (ed.). **Veterinary microbiology and microbial disease**. 2. ed. London: Wiley-Blackwell, 2011. p. 354-366.

R FOUNDATION FOR STATISTICAL COMPUTING. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna, 2018. Disponível em: <http://www.r-project.org>>. Acesso em: 27 maio 2019.

RAO, R. S.; GUPTA, N.; BHALLA, P.; AGARWAL, S. K. Leptospirosis in India and the rest of the world. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 7, n. 3, p. 178-193, 2003.

RENDE, J. C.; ÁVILA, F. A. Leptospirose bovina: perfil epidemiológico e dinâmica de infecção como zoonose. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 1, p. 71-79, 2003.

RINEHART, C. I.; ZIMMERMAN, A. D.; BUTERBAUGH, R. F.; JOLIE, R. A.; CHASE, C. C. Efficacy of vaccination of cattle with the *Leptospira interrogans* serovars Hardjo type Hardjoprajitno component of a pentavalent *Leptospira* bacterin against experimental challenge with *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo type Hardjo bovis. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 73, p. 735-740, 2012.

SÁNCHEZ, G. P. **Soroprevalência, isolamento e diagnóstico molecular para leptospirose em bovinos de fazendas de cria e de centrais de receptoras de embrião da região de Bauru – SP**. 2016. 110 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

SILVA, L. G. **Incidência de leptospirose em animais e em seres humanos em região representativa do noroeste do estado do Rio de Janeiro**. 2007. 70 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro, 2007.

SUMAN, V. B.; KHALID, P. Leptospirosis diagnosis: competency of various laboratory tests. **Journal of Clinical Diagnostic Research**, India, v. 8, p. 199-202, 2014.

THIBEAUX, R.; GIRAULT, D.; BIERQUE, E.; SOUPÉ-GILBERT, M. E.; RETTINGER, A.; DOUYÈRE, A.; MEYER, M.; IRAOLA, G.; PICARDEAU, M.;

GOARANT, C. Biodiversity of environmental *Leptospira*: Improving identification and revisiting the diagnosis. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 9, p. 816, 2018.

VASCONCELLOS, S. A.; ITO, F. H.; CÔRTEZ, J. A. Bases para a prevenção da brucelose animal. **Comunicação Científica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP**, São Paulo, v. 11, p. 25-36, 1987.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**. Paris: OIE, 2018. Disponível em: <http://www.oie.int/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>. Acesso em: 10 jun. 2019.

ZARANTONELLI, L.; SUANES, A.; MENY, P.; BURONI, F.; NIEVES, C.; SALABERRY, X.; BRIANO, C.; ASHFIELD, N.; DA SILVA, SILVEIRA.; DUTRA, F.; EASTON, C.; FRAGA M.; GIANNITTI, F.; HAMOND, C.; MACÍAS-RIOSECO, M.; MENÉNDEZ, C.; MORTOLA, A.; PICARDEAU, M.; QUINTERO, J.; RÍOS, C.; RODRÍGUEZ, V.; ROMERO, A.; VARELA, G.; RIVERO, R.; SCHELOTTO, F.; RIET-CORREA, F.; BUSCHIAZZO, A. Isolation of pathogenic *Leptospira* strains from naturally infected cattle in Uruguay reveals high serovar diversity, and uncovers a relevant risk for human leptospirosis. **PLoS Neglected Tropical Disease**, San Francisco, v. 12, n. 9, p. e0006694, 2018.

ANEXO 1

EXAME ANDROLÓGICO

A - IDENTIFICAÇÃO DO REPRODUTOR

Nome:	Raça:
Data de nascimento:	Nº de registro:
Endereço:	Telefone:
Propriedade:	Município:

Histórico da Propriedade: número de animais em reprodução ()

() vacinação de bezerras () sorodiagnóstico para brucelose () histórico de animais reagentes

() histórico de abortamento () retenção de placenta

() nascimento de produtos fracos () presença de orquite/epididimite

() monta natural () inseminação artificial

() aquisição de reprodutores

B - EXAME CLÍNICO

1. Histórico e anamnese:

2. Uso do reprodutor:

3. Exame genital: Circunferência escrotal: (em cm)

Consistência testicular:

4. Comportamento sexual:

5. Aprumos:

C – ESPERMIOGRAMA

I – MÉTODO DE COLETA:

II – CARACTERÍSTICAS FÍSICAS

1. Volume do ejaculado: (mL)
2. Turbilhonamento: (0 - 5)
3. Motilidade: (%)
4. Vigor: (0 - 5)
5. Concentração: (x 10⁶ / mL)

III – CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

1. DEFEITOS MAIORES (%)

ACROSSOMA:

GOTA CITOPLASMÁTICA PROXIMAL:

PATOLOGIA DA CABEÇA:

Subdesenvolvida:

Cabeça isolada patológica:

Piriforme:

Contorno anormal:

Cauda enrolada na cabeça total:

Estreita na base:

Pequena anormal:

“*Pouch formation*”:

FORMAS TERATOLÓGICAS:

PATOLOGIA DA PEÇA INTERMEDIÁRIA:

Fibrilação:

Edema:

Pseudogotas:

Fratura total e parcial:

Outros:

PATOLOGIA DA CAUDA:

Fortemente dobrada ou enrolada:

Dobrada com gota protoplasmática distal (anexa):

Total (Defeitos maiores) =

2. DEFEITOS MENORES (%)

PATOLOGIA DA CABEÇA:

Delgada:

Gigante:

Curta:

Larga:

Pequena normal:

Isolada normal:

ABAXIAL, RETROAXIAL ou OBLÍQUA:

CAUDA DOBRADA ou ENROLADA:

GOTA CITOPLASMÁTICA DISTAL:

Total (Defeitos menores) =

TOTAL DE ANOMALIAS (%) =

Observações:

IV - OUTROS ELEMENTOS

1. Medusas:

2. Células Primordiais:

3. Células Gigantes:

4. Leucócitos:

5. Hemácias:

6. Epiteliais:

D - CONCLUSÕES

O animal examinado foi considerado **apto** ou **inapto** à reprodução, segundo as características avaliadas.

Trabalho a ser enviado para a Revista: Biologicals**Performance of sperm viability, serological, molecular, and modified seminal plasma agglutination tests in the diagnosis of *Leptospira* in semen and serum of bovine bulls***

S.R. Maiolino ^a, A. Cortez ^b, H. Langoni ^a, R. Giuffrida ^c, Joeleni Rosa dos Santos ^a, G. Nardi Júnior ^d, G.H.B. Lara ^a, R.G. Motta ^a, M.G.M. Chacur ^c, F.M. Monteiro ^e, M.B. Heinemann ^f, A.F. Souza Filho ^f, M.G. Ribeiro ^{a**}

^a *São Paulo State University - UNESP, Botucatu, SP, Brazil*

^b *Santo Amaro University - UNISA, São Paulo, SP, Brazil*

^c *University of Oeste Paulista - UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brazil*

^d *Technology Faculty - FATEC, Botucatu, SP, Brazil*

^e *Paulista Agency of Technology - APTA, Sertãozinho, SP, Brazil*

^f *University of São Paulo - USP, São Paulo SP, Brazil*

* Place where the study was carried out: Department of Veterinary Hygiene and Public Health, UNESP, Botucatu, SP, Brazil

** Corresponding author: Infectious Diseases of Domestic Animals, School of Veterinary Medicine and Animal Science, UNESP, Botucatu, SP. Code 18618-681, Brazil.

E-mail address: marcio.ribeiro@unesp.br (M.G. Ribeiro)

ABSTRACT

Leptospirosis remains one of the most prevalent bacterial zoonosis worldwide, particularly among tropical countries. Due to the peculiar properties of leptospires, the diagnosis is neglected or unnoticed in livestock. Also, the majority of studies involving bovine leptospirosis have focused on the disease in cows. Given the considerable risk of infections in the reproductive tract of bulls and semen-shedding of leptospires, the present study investigated serum microscopic agglutination test (MAT) among 203 bovine bulls reproductively mature, in natural breeding of farms, without apparent signs of orchitis or inflammation of accessory reproductive glands. Simultaneously, the semen of all bulls was subjected to sperm viability analysis and conventional polymerase chain reaction (PCR) based on the gene *16S rRNA*. PCR-positive results of semen samples were confirmed by sequencing. Modified seminal plasma agglutination (MSPA) test replacing blood serum of all bulls by plasma seminal in MAT was assessed as well. Eight (8/203=3.9%) semen bulls were considered improper for reproduction service (necropermia and azoospermia). No agglutinins titers were identified among all bulls subjected to MSPA. High frequency (132/203=65%) of leptospiral agglutinins titers were identified at MAT, particularly to serovars from Sejroe serogroup, e.g., Hardjo CTG (100/203=49.3%), Wolffii (74/203=36.4%), Guaricura (72/203=35.5%), and Hardjoprajitno (56/203=27.6%). Three (3/203=1.5%) semen of bulls were positive to PCR *16S* gene, whereas these animals were negative to confirmation by sequencing. The high frequency of serovars from Sejroe serogroup, which are adapted to bovine species, indicate the need for periodic diagnosis, in addition to prophylactic and control measures against the disease, particularly to avoid transmission of the pathogen bovine-to-bovine, economic losses related to a reproductive failure caused by leptospires, and public health issue of the disease. To our knowledge, semen viability analysis, the investigation of anti-*Leptospira* antibodies by modified seminal plasma agglutination, and sequencing as confirmation test of semen PCR-positive were assessed for the first time on the diagnosis of leptospirosis in bovine bulls.

Keywords: bovine leptospirosis, seroprevalence, molecular diagnosis, breeding soundness evaluation.

1. Introduction

Leptospirosis is an infectious disease caused by spirochetes of the genus *Leptospira*, able to infect a wide variety of livestock, wildlife, and companion animals [1]. In humans has been considered one of the most common and worrying bacterial zoonosis worldwide, and an emergent disease particularly in developing and tropical countries [2].

The genus *Leptospira* was initially classified into two species: *L. interrogans* e *L. biflexa*, which comprised pathogenic and saprophytic organisms, respectively; with approximately 24 distinct serogroups and more than 250 serovars are recognized differentiated by cross agglutination absorption test. In the last decades, pathogenic *L. interrogans* complex was reclassified in genospecies based on DNA hybridization [3,4].

The epidemiology of leptospirosis among livestock may be understood classifying the relation between animals and pathogen into two groups called host-adapted and non-host adapted. The exposition of the host to adapted species and serovars of *Leptospira* result in reservoirs or maintenance animals [5]; as opposed an animal infected by non-adapted species/serovar of the pathogen may cause incidental or accidental clinical disease. The majority species of *Leptospira* are adapted to one or few restrict host, although potentially may cause disease in several animal species and humans [6]. In this context, reservoirs or maintenance animals are characterized by high susceptibility to infection but relatively low pathogenicity to an animal host, endemic transmission inter-species, a tendency to subclinical or chronic infections, renal persistence and prolonged shed of the organism in urine, as well as low serological response. In contrast, accidental or incidental infections shown minor susceptibility to infection, a tendency of acute and severe clinical signs, sporadic inter-species transmission, short renal phase e urine elimination, and high serological response [4].

L. Hardjo is the serovar most adapted to cattle globally [7], whereas depending of climate conditions and geographical areas other serovars also may be frequent in dairy farms, e.g. Pomona, Grippotyphosa, Bratislava, Icterohaemorrhagiae, and Guaricura [5]. In the coming years, based on advances in molecular techniques applied to taxonomy, two distinct genotypes of serovar Hardjo, serologically indistinguishable, are well-known: *L. interrogans* serovar Hardjo type Hardjoprajitno (formerly Hardjoprajitno) and *L. borgpetersenii* serovar Hardjo type Hardjobovis (formerly serovar Hardjobovis) [8].

In bovines, infection is commonly acquired by direct contact of mucous membranes, conjunctiva, and skin with urine, aborted fetus, and uterine discharges of

animals [9]. Intake of urine-contaminated water and feed, and venereal transmission are routes of infection as well. Bulls may contain the pathogen in the semen, and transmission by natural breeding or artificial insemination is possible [3]. The environmental resistance of pathogen, e.g. soil, and water, in addition to the warm temperature and rainfall periods, has been related to the seasonal increase of disease [6,10].

Abortion, stillbirth, milk drop syndrome, and infertility are major clinical signs and causes of economic losses related to bovine leptospirosis as a reproductive disease [10]. The routine diagnosis of bovine leptospirosis commonly is based on epidemiological and clinical data, isolation of bacteria and serodiagnosis by microscopic agglutination test (MAT) [3].

Conventional polymerase chain reaction (PCR), real-time quantitative PCR [11], and DNA hybridization have enabled currently taxonomic reclassification and specific diagnosis of leptospirosis using different clinical specimens [3,12,13]. The relation between serological (antigenic) and molecular (genetic) classifications is poor, although the serological approach is still convenient for epidemiological studies and routine diagnosis [12]. Also, pan-*Leptospira* whole-genome sequencing analyses have offered new insights on phylogeny and proposed discrimination of the genus *Leptospira* into three clades named pathogens, intermediates, and saprophytes [14].

The majority of comprehensive studies involving bovine leptospirosis has focused on dairy cows [12,13]. Despite well-recognized that leptospires could be eliminated by semen [3], restrict number of studies worldwide investigated the seroprevalence of disease in bovine bulls and/or risks regard shedding-semen of the pathogen [15,16,17,18], as well as there is no consensus among identification of leptospires in semen or serum using different methods of diagnosis. Also, the production of anti-*Leptospira* antibodies in the reproductive tract of bulls or abnormalities in the reproductive tract caused by leptospires that could influence on seminal viability were not studied in bovine bulls. In this scenario, 203 serum and semen samples from reproductive mature bovine bulls without inflammatory signs of reproductive tract were subjected to MAT, PCR, sequencing, and modified semen plasma agglutination replacing serum by plasma seminal of bulls.

2. Material and Methods

This study was developed in accordance with the Ethics Committee on Animal Use guidelines (CEUA / FMVZ – UNESP/Botucatu, São Paulo state), Brazil, protocol number 0213/2017.

2.1 Animals and samples

Bovine bulls were eligible for the study if they met the following criteria: 1) reproductive mature (older than 36 months of age), 2) absence of any apparent signs of orchitis or inflammation of accessory reproductive glands, 3) to be in reproductive activities on natural breeding of farms, 4) no vaccinated against leptospirosis 12 months ago. All the animals were breeding in similar conditions of nutrition, healthy, and management facilities.

A convenience serum and semen samples were simultaneously collected from 203 Nelore, Gir, Angus, Holstein and cross-breed bovine bulls. The animals belonged to farms from the center region of the Sao Paulo state of Brazil where bovine farming is common. Blood was aseptically collected from the jugular of all bulls using vacutainer™ (BD, Curitiba, SP, Brazil). Semen samples were aseptically collected from all bulls by electroejaculation and material immediately subjected to breeding soundness evaluation (sperm viability), classified in viable or not viable to reproduction [19]. An aliquot (2 mL) of the semen and blood serum (2 mL) was kept frozen to further serological and molecular diagnosis. Both serum (n=203) and semen (n=203) samples were collected once from each animal.

2.2. Microscopic agglutination test (MAT)

All serum samples were subjected to MAT with live 7-day-old cultures of leptospires. A panel of 16 serovars belonging to 10 serogroups was used, as follow: serovar Bratislava (serogroup Australis); Castellonis (Ballum); Canicola (Canicola); Djasiman (Djasiman); Grippytyphosa (Grippytyphosa); Copenhageni, Icterohaemorrhagiae (Icterohaemorrhagiae); Pomona (Pomona); Pyrogenes (Pyrogenes); Tarassovi (Shermani); Guaricura, Hardjobovis, Hardjo CTG, Hardjoprajitono, Mini, Wolffi (Sejroe). Sera were submitted to a twofold dilution, beginning at 1:100. The end-point titer was considered as the highest serum dilution presenting agglutination at least 50% [17], and cutoff of serum reaction was titer >100.

2.3. Modified semen plasma agglutination (MSPA)

All semen samples were subjected to MSPA. Initially, the samples were treated with 1% sodium azide (30 μ L of sodium azide/mL of semen) and immediately centrifuged [20]. Then, the plasma seminal was subjected to MAT as aforementioned, replacing blood serum by seminal plasma of bulls. Seminal plasma was submitted to a twofold dilution, beginning at 1:25. The end-point titer was considered as the highest serum dilution presenting agglutination at least 50% and cutoff of serum reaction was titer $\geq$ 25.

2.4. Molecular diagnosis

DNA extraction

DNA was extracted using DNAzol™ (Invitrogen, California, USA). As positive and negative controls of the reactions were used standard *Leptospira interrogans* serovar Pomona and ultrapure water, respectively.

Polymerase chain reaction (PCR)

Initially, a screening was performed using the 16S *rRNA* gene [21] and positive samples were confirmed by sequencing.

Briefly, 2.0 μ L of the DNA sample, 1x Master Mix™ (Promega, Madison, USA), 1.25 mM of each primer (16S *rRNA*, *Lep1* and *Lep2*), and ultrapure water, in a final volume of 20 μ L were used. The following cycles conditions were as follow: Initial denaturation at 94°C for 3 min, followed by 35 cycles of primer annealing at 94°C for 60 s, and a final extension at 72°C for 60 s. Reactions were carried out in a Multigene™ (Labnet International Inc., New Jersey, USA) thermocycler. PCR-products were analyzed in a 1.5% agarose gel stained by SYBR-Safe-Nitrogen™ (ThermoFischer Scientific, Massachusetts, USA) to an expected product of 330bp. A marker of molecular weight of 100bp was used.

Sequencing

Positive samples in PCR were subjected to sequencing by Sanger method using BigDye 3.1™ (Applied Biosystems, California, USA) and automatic sequencer ABI-3500™ (Applied Biosystems, California, USA). Sense and anti-sense sequences for each sample were subjected to program Phred/Phrap (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>) and used only sequences with score >20. The sequences were elaborated using program CAP3 (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>) and submitted to BLASTn to confirmation of leptospires (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

2.5. Statistical analyses

The number of reagent animals was expressed as a percent concerning a total of bovine bulls. Serological titers were considered as non-parametric variables and expressed in geometric mean $\pm$ geometric standard-deviations values. To analyze geometric mean, titers with zero (n=0) value were replaced by one (n=1), based on the formula as follow:

$$MG = \exp\left(\frac{1}{n} \sum \log(x_i + 1)\right) - 1$$

The number of bulls with titer >400 were compared with serovars using Q Cochran test, with contrasts by chi-square of MacNemar. The serological titers of each serovar were compared with Friedman test with contrasts by Dunn method. The statistical analyses were performed in software R (R Development Core Team, 2018), with significance level was set at 0.05.

3. Results

3.1. Microscopic agglutination test (MAT)

Leptospiral agglutinins at titers ≥ 100 were identified in 65.02% (132/203) of bulls at least one serovar. Serovars Hardjo CTG (100/203=49.3%), Guaricura (72/203=35.5%), Wolffi (74/203=36.4%), and Hardjoprajitno (56/203=27.6%) were prevalent, followed by minor frequencies of serovars Hardjobovis (16/203=7.9%) and Pyrogenes (3/203=1.5%). None bull showed a reaction to serovars Bratislava, Castellonis, Canicola, Copenhageni, Djasmin, Grippotypsosa, Icterohaemorrhagiae, Mini, Pomona and Tarassovi (Table 1).

Majority of reagent animals showed low titles of 100 (93/203=45.8%) and 200 (110/203=54.2%). High titles (≥ 400) were identified exclusively to serovars Hardjo CTG, Hardjoprajitno, Guaricura, and Wolffi (Table 1).

3.2. Semen viability

The semen of 3.9% (8/203) bulls were considered non-viable (improper) for reproduction services due to azoospermia and necrospermia abnormalities (Table 2). Among these eight bulls considered non-viable for reproduction service, 62.5% (5/8) were reagent exclusively to serovars from Sejroe serogroup (Wolffi, Guaricura,

Hardjoprajitno, and Hardjo CTG), presenting titles between 100 and 3200 to at least serovar.

3.3. Modified semen plasma agglutination (MSPA)

None bull revealed anti-*Leptospira* antibodies in MSPA (Table 2).

3.4. Molecular diagnosis

PCR using 16S *rRNA* gene detected 1.5% (3/203) of semen from bovine bulls, whereas these PCR-positive samples were not confirmed by sequencing (Table 2).

3.5. Statistical analyses

Among all bulls sampled reagent in MAT with titles ≥ 400 , 62.6% (127/203) and 2.5% (5/203) showed semen viable and non-viable to reproduction activities, respectively. The Q Chocharn revealed statistical differences between proportions of reagent in MAT (titles ≥ 400 in MAT) for the six serovars for the bulls with semen considerable viable ($p < 0.0001$). MacNemar test revealed that Hardjoprajitno and Hardjo CTG serovars were the most frequent in viable semen bulls, followed by Wolfi and Guaricura serovars, whereas Pyrogenes and Hardjobovis serovars were the less frequent in viable semen of bulls. No difference was observed between viable and non-viable ($p = 0.1136$) semen (Table 3 – supplementary file).

Friedman test showed differences between anti-*Leptospira* titles for different serovars in MAT and viable ($p < 0.001$) and non-viable ($p = 0.046$) semen quality of bulls. Dunn's tests revealed that the major titers were observed for the Hardjo CTG serovar. No association was observed between molecular techniques and MAT, MSPA, and semen viability results.

4. Discussion

The performance of serological and molecular methods in serum and semen of 203 bovine bulls in natural breeding of farm and without any apparent signs of abnormalities on the reproductive tract were evaluated to the diagnosis of leptospirosis. The results revealed the major frequency of serovars from Sejroe serogroup, and detection of three (1.5%) semen positive in PCR using 16S *rRNA* gene, which not was

confirmed by sequencing. Besides poor relation between serological and molecular diagnosis, the high prevalence of anti-*Leptospira* agglutinins among bovine bulls sampled indicate the need for periodic diagnosis and control measures against disease to avoid public health impact and economic losses related to a reproductive failure caused by leptospires. To our knowledge, semen viability analysis, the investigation of agglutinins anti-*Leptospira* in the semen (MSPA), and a combination of PCR and sequencing in the diagnosis of semen samples were assessed for the first time in bovine bulls to the diagnosis of leptospirosis.

Microbiological isolation of leptospires is considered valuable procedure to the diagnosis of animal leptospirosis [3,16,22]. Nevertheless, poor success on isolation has been reported using semen samples of bulls [15-17]; which may be credited to intermittent semen-shedding of leptospires [16], contamination of samples with conventional or opportunistic bacterium inhabitant from lower reproductive tract of bulls [15], minimum number of viable leptospires/mL need for identification of the pathogen [16,17], as well as high exigency required to laboratory diagnosis of the pathogen [15,23]. In this scenario, isolation of leptospires was not carried out in semen sampled of bulls, a fact that may be considered a limitation of the current study.

The major causes of low fertility of bovine bulls are testicular degeneration, delayed sexual maturity, testicular hypoplasia, abnormal spermiogenesis, and sexual immaturity. It is estimated that 20 to 40% of bovine bulls in reproductive age may present alterations on sperm viability, with consequent sub-fertility/infertility and poor breeding soundness, which may be attributed to different causes, including infectious agents [19]. In the bulls sampled, only 3.5% (8/203) were considered improper to reproduction services due to abnormalities on the viability of semen, e.g., necrospemia and azoospermia. From these eight bulls, only three revealed high titles (≥ 400) in MAT to serovars from Sejroe serogroup (Hardjo CTG, Hardjoprajitno) (Table 2), although any these animals had positive results in molecular diagnosis of leptospires from semen. Nevertheless, was expected that bulls with high serological titles in MAT present semen-shedding of leptospires [24]. Conversely, has been reported that active infection by leptospires among bovines may occur in the absence of detectable anti-*Leptospira* agglutinins and that serology response not is directly associated with carrier status [1,25]. These facts limit the exclusive use of serological techniques to confirm the diagnosis. These discrepancies or poor relation between serological and molecular diagnosis identified in bulls sampled are consistent with similar studies, and may be attributed to intermittent seminal-shedding of the pathogen by reproductive tract of bulls [15,16]; a

fact that will be solved by sequentially sampled the semen from the same bull and combination of methods to improve diagnosis.

Semen plasma agglutination constitute a method standardized to the diagnosis of bovine brucellosis, due to predilection of *Brucella abortus* by the reproductive tract of bulls. In fact, some bovine bulls may present low or lack serological titles, although be infected and semen-shedding *Brucella abortus* [20]. In the current study, this hypothesis was investigated, and none bull showed anti-*Leptospira* antibodies in MSPA (Table 2), besides low titles (25 and 50) used in this modified semen plasma agglutination, as opposed title 100 conventionally recommended as the cut-off to serodiagnosis using MAT. This finding indicates that investigation of anti-*Leptospira* agglutinins in semen is not proper to diagnosis, probably because the infection by leptospires is non-restricted to the genital tract of bovine bulls.

MAT is the decade-long gold standard and most commonly routine serological method used to diagnosis of bovine leptospirosis worldwide [3,12,26]. The majority of the studies involving bovine leptospirosis have been carried out with cows, and serovars from Sejroe group (Hardjo CTG, Hardjoprajitno, Guaricura, and Wolffi) are predominant, with a great variation on frequencies of serovars among different countries [7,8,12,13]. Likewise, in Brazil Sejroe serovars are most commonly identified, with prevalence ranged 45% to 97% at least one serovar, although serovars belonging to other groups has been reported, e.g., Grippotyphosa, Shermani, Icterohaemorrhagiae, Bratislava, Pyrogenes, Canicola, and Pomona [27-30]. This diversity of serovars and genospecies involved in *Leptospira*-induced infections in bovines may be influenced by different factors, e.g., weather conditions of regions or countries, co-habitation of bovines with other domestic and wildlife species [6,10,31], flux, general management, and reproduction systems of animals (natural breeding, artificial insemination, transference of embryos) [3,12], and vaccine prophylaxis [32,33]. In the current study, besides the diversity and influence of these aforementioned factors has not been investigated, the high seroprevalence (65%) of serovars from Sejroe group, particularly Hardjo CTG (49.3%), Wolffi (36.4%), Guaricura (35.5%), and Hardjoprajitno (27.6%), indicate the need for periodic diagnosis of leptospirosis. Also, since bovines are well-known host-maintained leptospires infections in farms, particularly serovars from Sejroe group [4], measures of prophylaxis and control of disease cow-to-cow are recommended among farms studied, including vaccination, quarantine period to recent acquired animals, isolation and treatment of infected animals [3,10,12].

A significant association was observed between serological titres in MAT for different serovars in bulls with viable ($p < 0.001$) and non-viable ($p = 0.046$) semen. Conversely, the frequency of reagent bulls for each serovar was not different between bulls with viable and non-viable semen. This result suggests that the prevalence to a specific serovar of leptospires is not related with the ability for reproduction services, although a low number of bulls sampled considered improper to reproduction (non-viable semen) may have decrease power of the statistical test.

In coming years, the molecular approaches have enabled taxonomic reclassification of leptospires, identification of new serovars and genospecies, and diagnosis of the pathogen in different clinical specimens and tissues, including samples where the microorganism is not viable as well [1,13,14]. In particular, the molecular diagnosis of *Leptospira*-induced infections in bulls has revealed inconsistent results, with both detection [17] and no identification of the pathogen in semen [15,16]. The limitation of the molecular diagnosis based on conventional PCR has been attributed to a minimal number of viable leptospires/mL of semen samples [16,17,18], intermittent semen-shedding of leptospires, and the presence of inhibitors in ejaculate that may block the extraction of bacterial DNA to the diagnosis [1,16]. Among bulls enrolled in this study, three (1.5%) semen samples were positive to PCR with 16S gene, as opposed these positive-results were not confirmed by sequencing; a result that may be attributed to higher specificity of the sequencing when compared with conventional PCR.

It is estimated that 1 million cases and 60,000 human fatalities annually are caused by leptospirosis worldwide, mostly impacting rural or suburban populations located in tropical and subtropical regions and countries, especially Brazil [34]. Infected animals, including bovines, constitute an active reservoir for the dissemination of the pathogen, particularly for humans exposed to water and soil contaminated by urine of infected reservoir animals [14], e.g., veterinarians, abattoir, farm and laboratory workers [1-2]. Thus, surveillances focused on a combination of different microbiological, serological, and molecular approaches is a need for better knowledge of the virulence aspects and geographical distribution of serovars and genospecies, which may contribute with epidemiological knowledge of the disease and to support prophylactic measures against *Leptospira*-induces infections among domestic animals and humans.

Overall, the high frequency of serovars from Sejroe serogroup indicates the need for periodic diagnosis, as well as prophylactic and control measures against the disease, particularly to avoid transmission of the pathogen bovine-to-bovine, economic losses related to a reproductive failure caused by bovine leptospirosis, and public health issue

represented by pathogenic leptospires. Poor relation between serological diagnosis and molecular detection of leptospires in semen was observed. Also, to our knowledge, semen viability analysis, the investigation of anti-*Leptospira* antibodies by modified seminal plasma agglutination, and sequencing as confirmative test of semen from PCR-positive bovine bulls were assessed for the first time on the diagnosis of leptospirosis.

Acknowledgments

We thank the National Council for Scientific and Technological Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq), Brazil, for research productivity fellowships (PQ) given to Márcio Garcia Ribeiro (number 306116/2016-2) and Marcos Bryan Heinemann (number 309146/2017-8).

References

- [1] Ellis WA. Animal leptospirosis. *Current Top Microbiol Immunol* 2015;387:99-137.
- [2] Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira MS. Global morbidity and mortality of leptospirosis: a systematic review. *PLoS Negl Infect Dis* 2015;9:e0003898, 2015.
- [3] Adugna S. A review of leptospirosis. *Europ J Appl Sci* 2016;8(6):347-355.
- [4] Constable PD, Hinchliff KW, Done S, Gruenberg W. *Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats*. USA: Saunders Ltd; 2016. p. 1115-1129.
- [5] Loureiro AP, Hamond C, Pinto P, Bremont S, Bourhy P, Lilenbaum W. Molecular analysis of leptospires from serogroup Sejroe obtained from asymptomatic cattle in Rio de Janeiro - Brazil reveals genetic proximity to serovar Guaricura. *Res Vet Sci* 2016;105:249-253.
- [6] Correia L, Loureiro AP, Lilenbaum W. Effects of rainfall on incidental and host-maintained leptospira infections in cattle in a tropical region. *Vet J* 2017;220:63-64, 2017.
- [7] Lucchese L, Benkirane A, Hakimi I, El Idrissi A, Natale A. Seroprevalence study of the main causes of abortion in dairy cattle in Morocco. *Vet Ital* 2016;52(1):13-19.

- [8] Llanes A, Restrepo CM, Rajeev S. Whole genome sequencing allows better understanding of the evolutionary history of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. PLoS One 2016;11(7):e0159387.
- [9] Favero JF, Araujo HL, Lilenbaum W, Machado G, Tonin AA, Baldissera MD, Stefani LM, Silva AD. Bovine leptospirosis: Prevalence, associated risk factors for infection and their cause-effect relation. Microb Pathog 2017;107:149-154.
- [10] Martins G, Lilenbaum W. Control of bovine leptospirosis: Aspects for consideration in a tropical environment. Res Vet Sci 2017;112:156-160.
- [11] Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Turner DE, Steigerwalt AG, Mayer LW. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. J Med Microbiol 2005;54:45-49.
- [12] Prajapati A, Kushwaha A, Chayanika D, Subhashree N, Varsha P, Marcia A, Lahari L, Shivashankar P, Patel N. A Review on bovine leptospirosis with special reference to seroprevalence in India. Intern J Curr Microbiol App Sci 2018;7(4):1813-1820.
- [13] Zarantonelli L, Suanes A, Meny P, Buroni F, Nieves C, Salaberry X, Briano C, Ashfield N, Da Silva S, Dutra F, Easton C, Fraga M, Giannitti F, Hamond C, Macías-Rioseco M, Menéndez C, Mortola A, Picardeau M, Quintero J, Ríos C, Rodríguez V, Romero A, Varela G, Rivero R, Schelotto F, Riet-Correa F, Buschiazzi A. Isolation of pathogenic *Leptospira* strains from naturally infected cattle in Uruguay reveals high serovar diversity, and uncovers a relevant risk for human leptospirosis. PLoS Negl Trop Dis 2018;12(9):e0006694.
- [14] Thibeaux R, Girault D, Bierque E, Soupé-Gilbert ME, Rettinger A, Douyère A, Meyer M, Iraola G, Picardeau M, Goarant C. Biodiversity of environmental *Leptospira*: Improving identification and revisiting the diagnosis. Front Microbiol 2018;9:1-14.
- [15] Magajevski FS, Girio RJS, Mathias LA, Myashiro S, Genovez, M.E.; Scarcelli, E.P. Detection of *Leptospira* spp. in the semen and urine of bulls serologically reactive to *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. Braz J Microbiol 2005;36(1):43-47.
- [16] Ganda MR, Souza MPS, Lourencetti MPS, Ciuffa AZ, Soares PM, Moreira RQ, Lima AMC. Molecular detection of *Leptospira* spp. in bull semen. Revue Méd Vét 2016;11-12(167):297-301.
- [17] Heinemann MB, Garcia JF, Nunes CM, Morais ZM, Gregori F, Cortez A, Vasconcellos SA, Visintin JA, Richtzenhain LJ. Detection of leptospires in bovine semen by polymerase chain reaction. Austr Vet J 1999;77(1):32-34.

- [18] Heinemann MB, Garcia JF, Nunes CM, Gregori F, Higa ZM, Vasconcellos SA, Richtzenhain LJ. Detection and differentiation of *Leptospira* spp. serovars in bovine semen by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. *Vet Microbiol* 2000;73(4):261-267.
- [19] Kastelic JP, Thundathil JC. Breeding soundness evaluation and semen analysis for predicting bull fertility. *Reprod Dom Anim* 2008;43 Suppl 2:368-373.
- [20] Nardi Júnior G, Megid J, Mathias LA, Paulin L, Vicente AF, Cortez A, Listoni FJP, Lara GHB, Motta RG, Chacur MGM, Monteiro FM, Ribeiro MG. Performance of microbiological, serological, molecular, and modified seminal plasma methods in the diagnosis of *Brucella abortus* in semen and serum of bovine bulls. *Biologicals* 2017;48:6-9.
- [21] Merien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G, Sanint-Girons T. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J Clin Microbiol* 1992;30(9):2219–2224.
- [22] Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, Fitzpatrick ES, Fanning S, Hartigan PJ. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. UK: Wiley-Blackwell; 2011. p.354-366.
- [23] Suman VB, Kalid P. Leptospirosis diagnosis: competency of various laboratory tests. *J Clin Diagn* 2014;8(1):199-202.
- [24] Mughini-Gras L, Bonfanti L, Natale A, Comin A, Ferronato A, La Greca E, Patregnani T, Lucchese L, Maragon S. Application of an integrated outbreak management plan for the control of leptospirosis in dairy cattle herds. *Epidemiol Infect* 2014;142(6):1172-1181.
- [25] Thieman AB. Bovine leptospirosis: bacteriologic versus serologic diagnosis of cows at slaughter. *Am J Vet Res* 1983;44(12):2244-2245.
- [26] World Organisation for Animal Health. *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*. Paris, 2018:503-516.
- [27] Homem VSF, Heinemann MB, Moraes ZM, Vianna MCB, Silva JCR, Sakamoto SM, Pinheiro SR, Veiga JB, Lau, HD, Quanz D, Tourrand JF, Ferreira F, Ferreira Neto JS. Leptospirase bovina em Uruará, município da Amazônia oriental. *Arq Inst Biol* 2000;67(1):1-10.
- [28] Langoni H, Meireles LR, Gottschalk S, Cabral KG, Silva AV. Perfil sorológico da leptospirase bovina em regiões do estado de São Paulo. *Arq Inst Biol* 2000;67(1):37-41.

- [29] Juliano RS, Chaves NST, Santos CA, Ramos LS, Santos HQ, Meireles LR, Gottschalk S, Corrêa Filho RAC. Prevalência e aspectos epidemiológicos da leptospirose bovina em rebanho leiteiro na microrregião de Goiânia – GO. *Ciênc Rural* 2000;30(5):857-862.
- [30] Miashiro AF, Vasconcellos SA, Moraes ZM, Souza GO, Leal Filho JM, Figueiredo AO, Pellegrin AO. Prevalência de leptospirose em rebanhos bovinos no Pantanal de Mato Grosso do Sul. *Pesq Vet Bras* 2018;38(1):41-47.
- [31] Petrakovsky J, Bianchi A, Fisun H, Nájera-Aguilar P, Pereira MM. Animal leptospirosis in Latin America and the Caribbean countries: reported outbreaks and literature review (2002-2014). *Int J Environ Res Public Health* 2014;11(10):10770-10789.
- [32] Bondurant RH. Venereal diseases of cattle: natural history, diagnosis, and the role of vaccines in their control. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2005;21(2):383-408.
- [33] Adler B. Vaccines against leptospirosis: Cellular and molecular aspects. *Vet Microbiol* 2010;140:287-296.
- [34] Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira MS, Stein C, Abela-Ridder B, Ko A. Global morbidity and mortality of leptospirosis: A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis* 2015;9(9):e0003898.

NORMAS DA REVISTA: BIOLOGICALS

Biologicals provides a modern and multidisciplinary international forum for news, debate, and original research on all aspects of biologicals used in human and veterinary medicine. The journal publishes original papers, reviews, and letters relevant to the development, production, quality control, and standardization of biological derived from both novel and established biotechnologies. Special issues are produced to reflect topics of particular international interest and concern. Three types of papers are welcome: original research reports, short papers, and review articles. Review articles are generally invited by Editors to synthesize knowledge in rapidly advancing research areas relevant to biologicals and diagnostics. However, well-written contributions from authors with established expertise in any given field are welcomed by the editorial team. Authors considering submitting review articles are encouraged to contact the editor-in chief before submission to establish the suitability of the subject of the review for Biologicals. The journal will also publish comments and letters to the editor, book reviews, meeting reports and information on regulatory issues.

BIOLOGICALS SHORT PAPER GUIDELINES:

Short papers should not exceed 1,500 words of text, not counting the abstract, figure legends, and references. The abstract without any subheadings must not exceed 150 words. No more than 3 figures/tables and 20 references are allowed.

BIOLOGICALS LETTER TO THE EDITOR GUIDELINES:

A Letter to the Editor should have no abstract, double-spaced text of less than five pages, no more than one illustration (table or figure) and less than 6 references.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:**Manuscript:**

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements