

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS NO DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO
LEPTOSPÍRICA EM OVINOS E IMPLICAÇÕES NA SAÚDE PÚBLICA**

FELIPE FORNAZARI

Botucatu-SP

Fevereiro de 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS NO DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO
LEPTOSPÍRICA EM OVINOS E IMPLICAÇÕES NA SAÚDE PÚBLICA**

FELIPE FORNAZARI

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para obtenção
do título de Mestre

Orientador: Prof. Titular Helio Langoni

Botucatu-SP

Fevereiro de 2012

Felipe Fornazari. Comparação de técnicas no diagnóstico da infecção leptospírica em ovinos e implicações na saúde pública. Defesa: 27/02/2012. Local: FMVZ/UNESP – Campus de Botucatu/SP.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Titular Helio Langoni

Presidente e Orientador

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu/SP

Profa. Titular Jane Megid

Membro Titular

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu/SP

Profa. Assistente Dra. Márcia Marinho

Membro Titular

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal

Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – UNESP – Araçatuba/SP

Prof. Paulo Francisco Dominguez

Membro Suplente

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu/SP

Fabio Hiroto Shimabukuro

Membro Suplente

Laboratório de Hepatites Virais e Leptospirose

Instituto Adolfo Lutz

DEDICATÓRIA

Aos meus pais:

**Claribel Ortelan Fornazari, meu maior exemplo de dedicação aos estudos
e porto seguro nos momentos de maior dificuldade.**

**Sérgio Fornazari Jr: desenhista, músico, arquiteto, engenheiro, fotógrafo
e fonte inesgotável de conhecimento que me inspirou durante toda a
minha vida.**

Vocês são os melhores pais do mundo

**À minha falecida avó, Dalva de Oliveira Ortelan, que durante minha
infância sempre me acolheu em seu sítio, no qual despertei grande parte
do meu amor pela natureza e pelos animais.**

Amo muito vocês

AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao professor Helio Langoni. Desde a graduação o senhor foi muito importante para a minha formação profissional. Muito obrigado por todos os ensinamentos e oportunidades.

Ao professor e grande amigo Carlos Roberto Teixeira (Carlinhos). Muito obrigado pela liberdade para trabalhar com animais selvagens do CEMPAS, e à confiança em mim depositada.

Ao amigo Rodrigo Costa da Silva, por todos os ensinamentos, ajuda nas coletas, análise estatística, e por ajudar nos exames de PCR durante o feriado.

À professora Maria Cecília Rui Luvizotto e ao amigo Hugo Enrique Orsini Beserra, pela realização das técnicas histopatológicas.

À amiga Lucilene Granuzzio Camossi “Ducetinha da minha vida”. Exemplo de dedicação ao trabalho e grande parceira de projetos. Obrigado por me ajudar nas coletas, pela companhia, e por todas as demais atividades realizadas na zoonoses.

Àqueles que acordaram de madrugada para me ajudar nas coletas do abatedouro: Leila, Ana, Benedito, Diego (Mogle), e estagiários da zoonoses.

À amiga Virginia (Virjaina), por aturar minha impaciência e humor negro e, principalmente, por ajudar na PCR em tempo real.

Ao meu melhor amigo Felipe de Freitas Guimarães (Filão) e à minha melhor amiga Eliana Paladino (Rorosa). Vocês são os irmãos que eu nunca tive. Embora não tenham me ajudado diretamente neste trabalho, nossa amizade foi muito importante nos últimos anos, e espero que vocês sempre estejam presentes em minha vida.

À amiga Luisa Martelli Soares (Pão), pela amizade e pelas maravilhosas refeições que me ajudaram muito nas minhas noites de estudo.

À grande amiga Pamela Marson (PamÉla), fonte inesgotável de ajuda nas horas de maior necessidade. Muito obrigado pelas dicas de biomol e pelas fotos do abatedouro. “Very nice ...”

À pessoa mais discreta do departamento: Selene Babboni (Zuli, Zuli Zuli). Muito obrigado pela ajuda com os animais selvagens. Sua amizade me rendeu muitos momentos de alegria e diversão. E viva a Copavet !!!

À professora Sheila Canevese Rahal, pela amizade e ajuda nos trabalhos realizados com animais selvagens.

À Fapesp, pelo suporte financeiro mensal e pelo auxílio pesquisa, sem o qual esse trabalho não seria possível.

À Fundação “Prof. Martin Tielen” e à pró-reitoria da UNESP, por financiarem minha participação no XV Congresso Internacional de Higiene Veterinária, em Viena, no qual foi possível apresentar dados parciais deste trabalho.

Lista de Tabelas

TABELA 1: Resultado da SAM, PCR, qPCR, cultivo bacteriano e técnica de WS de ovinos soropositivos para leptospirose, provenientes de abatedouro do município de São Manuel. Botucatu, 2011	34
TABELA 2: Associação entre os resultados da SAM e do cultivo bacteriano, técnica de WS, PCR e qPCR para a detecção de <i>Leptospira</i> spp. em amostras de rim e fígado de ovinos soropositivos para leptospirose, provenientes de abatedouro do município de São Manuel, SP. Botucatu, 2011	35
TABELA 3: Associação entre a qPCR e cultivo bacteriano, técnica de WS e PCR para a detecção de <i>Leptospira</i> spp. em amostras de rim e fígado de ovinos soropositivos para leptospirose, provenientes de abatedouro do município de São Manuel, SP. Botucatu, 2011	36
TABELA 4: Correlação entre os títulos da SAM, independente do sorovar, específico para o sorovar, e específico para a sorovariante mais frequente, e o resultado da PCR quantitativa para a detecção de DNA de <i>Leptospira</i> spp. em amostras de rim e fígado de ovinos provenientes de abatedouro do município de São Manuel, SP. Botucatu, 2011.....	37
TABELA 5: Mediana (Md), percentil 25% (P25) e 75% (P75) da carga bacteriana (bactérias/μL) aferidas pela qPCR em amostras de rim e fígado de ovinos soropositivos para leptospirose provenientes de abatedouro do município de São Manuel, SP. Botucatu, 2011	38

Lista de Figuras

- FIGURA 1: Fluxograma ilustrando as amostras biológicas utilizadas, a sequência dos procedimentos, e as análises realizadas para a detecção de *Leptospira* spp. em ovinos. Botucatu, 2011.....28
- FIGURA 2: Coleta de sangue após sangria de ovinos proveniente de abatedouro localizado em São Manuel, SP. Botucatu, 2011.....29
- FIGURA 3: Etapa de evisceração de carcaças de ovinos em abatedouro localizado em São Manuel, SP. Botucatu, 201129
- FIGURAS 4 e 5: Coleta de rim e fragmento de fígado durante processo de evisceração de ovino em abatedouro localizado em São Manuel, SP. Botucatu, 201129
- FIGURA 6: Eletroforese horizontal de amostras renais e hepáticas de ovinos submetidas à PCR, ilustrando as bandas de amostras positivas (setas verdes), controles positivos (setas azuis), controles negativos (setas vermelhas) e os marcadores moleculares (*ladder*) (setas brancas). Botucatu, 2011.....38
- FIGURA 7: Gráfico ilustrando a intensidade de fluorescência emitida por duas amostras renais de ovinos positivas (setas verdes) pela PCR quantitativa, de acordo com o ciclo de amplificação. As demais amostras são referentes à curva padrão. Botucatu, 2011.....39
- FIGURA 8: Imagem de microscopia óptica comum (100x) de tecido renal de ovino soropositivo para leptospirose, corado pela técnica de Warthin Starry, ilustrando estrutura compatível com leptospira (seta azul). Botucatu, 201140

Lista de abreviaturas

bact/ μ L: bactérias/ μ L

DNA: ácido desoxirribonucleico

E: especificidade

ELISA: ensaio imunoenzimático

EMJH: Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris

IC: intervalo de confiança

Md: Mediana

OMS: Organização Mundial da Saúde

PCR: reação em cadeia pela polimerase

qPCR: PCR quantitativo

rpm: rotações por minuto

S: sensibilidade

SAM: soroaglutinação microscópica

SP: São Paulo

SST: solução salina tamponada

Técnica de WS: técnica de Warthin Starry

VPN: valor preditivo negativo

VPP: valor preditivo positivo

Sumário

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
Introdução	1
Revisão de literatura	4
2.1 Etiologia	5
2.2 Aspectos gerais da leptospirose nos animais	6
2.2.1 Epidemiologia	6
2.2.1.1 Distribuição	6
2.2.1.2 Transmissão	6
2.2.1.3 Reservatórios	7
2.2.2 Patogenia	9
2.2.3 Sinais clínicos	9
2.2.4 Diagnóstico	10
2.2.5 Tratamento	12
2.2.6 Prevenção	13
2.3 Particularidades da leptospirose ovina	14
2.4 Aspectos de saúde pública	15
Objetivos	17
Material e métodos	19
4.1 Delineamento experimental	20
4.2 Animais	20
4.3 Colheita e preparação das amostras	21
4.4 Sorologia	22
4.5 Cultivo bacteriano	23
4.6 Extração de DNA	24
4.7 PCR (convencional)	25
4.8 Eletroforese	25
4.9 PCR quantitativa	26
4.10 Técnica de Warthin Starry	26
4.11 Análise estatística	27
Resultados	30
5.1 Sorologia	31
5.2 Cultivo bacteriano	31
5.3 Técnica de Warthin Starry	31
5.4 PCR	32
5.5 qPCR	32
Discussão	41
Conclusões	53
Referências bibliográficas	55
Artigo científico	71

FORNAZARI, F. Comparação de técnicas no diagnóstico da infecção leptospírica em ovinos e implicações na saúde pública. Botucatu, 2012. 100p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu, São Paulo.

RESUMO

A leptospirose é uma enfermidade infecto-contagiosa, de caráter zoonótico, que possui grande importância mundial. É causada por diversas espécies de bactérias patogênicas do gênero *Leptospira*, ocorrendo com maior frequência em regiões tropicais com condições sanitárias precárias. A infecção ocorre pelo contato direto ou indireto com a urina de animais infectados, e pode variar de assintomática até quadros clínicos graves que causam a morte. A leptospirose em ovinos é responsável por queda na produção animal, e por riscos para a saúde pública. O desenvolvimento de técnicas de diagnóstico permite identificar animais doentes, auxiliando no tratamento precoce, controle de reservatórios, e na prevenção da enfermidade. O presente estudo teve como objetivo principal comparar diferentes técnicas de diagnóstico na leptospirose em ovinos. Amostras de rim, fígado e sangue foram coletadas de 465 animais provenientes de um abatedouro. O soro foi submetido à Soroaglutinação Microscópica (SAM), e as amostras de rim e fígado dos animais soropositivos foram individualmente analisadas por quatro técnicas: cultivo bacteriano, técnica de Warthin Starry (WS), PCR convencional (PCR) e PCR quantitativa (qPCR). Amostras teciduais de 15 ovinos soronegativos, escolhidos aleatoriamente, foram utilizadas como controles negativos. No exame sorológico 21 animais foram positivos (4,5%) para os sorovares Hardjo (n=12), Hebdomadis (n=5), Sentot (n=2), Wolfii (n=1) e Shermani (n=1). Os títulos apresentados foram 100 (n=10), 200 (n=2), 400 (n=6) e 1600 (n=3). No cultivo bacteriano nenhum animal apresentou resultado positivo; na técnica de WS quatro animais foram positivos em amostras de rim, e nenhum de fígado; na PCR seis animais foram positivos em amostras de rim, e nenhum de fígado; e na qPCR 11 animais foram positivos, 8 em amostras de rim e três em amostras de fígado. A quantificação bacteriana resultante da qPCR revelou mediana de

4,32 bactérias/ μ L em amostras de fígado e 36,67 bactérias/ μ L em amostras de rim. A qPCR apresentou a maior sensibilidade entre as técnicas, seguida da PCR, técnica de WS e cultivo bacteriano. Houve correlação positiva entre os títulos obtidos na SAM e a carga de leptospiros em rim de animais soropositivos para as sorovariantes Hardjo C.T.G. e Hardjo prajitno. A maior frequência de animais soropositivos para o sorovar Hardjo corrobora com dados presentes na literatura, onde leptospiros pertencentes ao sorogrupo Sejroe são as mais comuns na espécie ovina. Diversos estudos têm comprovado a eficiência das técnicas de PCR para a detecção de leptospiros tanto nos animais como no homem, assim como em vários tipos de amostras biológicas. São escassos os trabalhos envolvendo estas técnicas em ovinos, e não há registro da utilização da qPCR para a pesquisa de leptospiros nesta espécie. Os resultados do presente estudo indicam a presença de *Leptospira* spp. em amostras teciduais de ovinos, especialmente às pertencentes ao sorogrupo Sejroe; e a qPCR é uma técnica eficiente para a detecção de *Leptospira* spp. em amostras de fígado e rim de ovinos.

Palavras-chave: leptospirose, diagnóstico, PCR, ovinos, saúde pública

FORNAZARI, F. Comparison of techniques in the diagnosis of leptospiral infection in sheep and implications for public health. Botucatu, 2012. 100p. Dissertation (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu, São Paulo.

ABSTRACT

Leptospirosis is an infectious disease, of zoonotic character, which has great importance worldwide. It is caused by several species of pathogenic bacteria of *Leptospira* genera, occurring more frequently in tropical regions with poor sanitary conditions. The infection occurs by direct or indirect contact with urine of infected animals, and can vary from asymptomatic to severe clinical pictures that lead to death. Leptospirosis in sheep is responsible for decrease in animal production, and for risks in public health. The development of diagnostic techniques allows to identifying sick animals, assisting in early treatment, reservoirs control, and disease prevention. The present study had as main objective to compare different techniques of leptospirosis diagnostic in sheep. Samples of kidney, liver and blood were collected from 465 animals originated from a slaughterhouse. The sera were submitted to Microscopic Agglutination Test (MAT), and kidney and liver samples of seropositive animals were individually analyzed by four techniques: bacteriological culture, Warthin Starry (WS) technique, conventional PCR (PCR), and quantitative PCR (qPCR). Tissue samples from 15 seronegative sheep, chosen randomly, were used as negative controls. In serologic exam 21 animals were positive (4.5%) to serovars Hardjo (n=12), Hebdomadis (n=5), Sentot (n=2), Wolfii (n=1) and Shermani (n=1). The titers presented were 100 (n=10), 200 (n=2), 400 (n=6) and 1600 (n=3). In bacteriologic culture no animal presented positive result; in WS technique four animals were positive in kidney samples, and none in liver; in PCR six animals were positive in kidney samples, and none in liver; and in qPCR 11 animals were positive, 8 in kidney samples and three in liver samples. The bacterial quantification resulting from qPCR revealed median of 4.32 bacteria/ μ L in liver samples and 36.67 bacteria/ μ L in kidney samples. qPCR presented the higher sensitivity among the techniques, followed by PCR, WS

technique and bacteriologic culture. There was a positive correlation between MAT titers and leptospiral load in kidney from seropositive animals to serovariants Hardjo C.T.G. and Hardjo prajitno. The highest frequency of animals seropositive to serovar Hardjo corroborates with data present in literature, where leptospires belonging to Sejroe serogroup are the most common in sheep. Several studies have proven the efficiency of PCR techniques to detect leptospires in both animals and men, as well as in many types of biologic samples. The studies involving these techniques in sheep are scarce, and there is no data regarding the use of qPCR to detect leptospires in that species. The results of the present study indicates the presence of *Leptospira* spp. in tissue samples of sheep, specially those from Sejroe serogroup; and the qPCR is an efficient technique to detect *Leptospira* spp. in liver and kidney samples from sheep.

Key-words: leptospirosis, diagnostic, PCR, sheep, public health.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose que possui grande importância no contexto de saúde animal e saúde pública. Animais domésticos podem apresentar queda na produção e, dessa forma, causar prejuízos econômicos. Além disso, a leptospirose pode ser responsável por uma elevada mortalidade, não somente nos animais de produção, mas também nos animais de companhia e no homem (LEVETT, 2001).

A leptospirose em ovinos é pouco estudada (SILVA et al., 2007), porém, sabe-se que estes animais são importantes reservatórios em algumas regiões (LILENBAUM et al., 2009), e podem representar importantes fontes de infecção para o homem e para outras espécies domésticas (GERRITSEN et al., 1994).

O desenvolvimento e aprimoramento das técnicas de diagnóstico são fundamentais no controle e prevenção da leptospirose. Alta sensibilidade, custo acessível, e mão de obra disponível são características necessárias para a implementação de um método de diagnóstico que possa ser utilizado em larga escala. Estudos voltados para este assunto são realizados com maior frequência para o diagnóstico da leptospirose humana (MERIEN et al., 2005; SEGURA et al., 2005; OOTEMAN et al., 2006; BOURHY et al., 2011; THAIPADUNPANIT et al., 2011). Devido aos riscos de transmissão que os ovinos oferecem para o homem, o aperfeiçoamento das técnicas de diagnóstico nesta espécie é de grande importância em saúde pública.

Existem diversas técnicas para o diagnóstico de leptospirose, sendo a soroaglutinação microscópica (SAM) a mais utilizada (WHO, 2003). O campo escuro e o cultivo bacteriano também são métodos empregados com frequência, porém, assim com a SAM, são técnicas muito antigas, que apresentam algumas desvantagens em relação à sensibilidade e praticidade no diagnóstico.

A partir do início da década de 1990 as técnicas biomoleculares começaram a ser empregadas para o diagnóstico de diversas enfermidades infecciosas, entre elas a leptospirose (CARVALHO et al., 2010). A reação em cadeia pela polimerase (PCR) é uma das mais utilizadas. Esta técnica consiste em pesquisar moléculas de DNA de um determinado organismo, e reproduzi-la

várias vezes para que seja possível sua detecção. As principais vantagens apresentadas pela PCR são sua alta sensibilidade e resultado rápido, tornando esta técnica muito útil para o diagnóstico de enfermidades infecciosas, tanto nos animais como no homem.

Com o propósito de contribuir para o diagnóstico de leptospirose, o presente trabalho teve como objetivo principal comparar diferentes técnicas empregadas na detecção de *Leptospira* spp. na espécie ovina.

Revisão de literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Etiologia

A leptospirose é causada por diversas espécies de bactérias do gênero *Leptospira*, família Leptospiraceae, ordem Spirochaetales. Sua nomenclatura e taxonomia são complexas. Até 1989 se conheciam somente duas espécies: *L. interrogans*, que agrupava as bactérias patogênicas; e *L. biflexa*, que incluía bactérias saprófitas, não-patogênicas, e presentes no ambiente (LEVETT, 2001; GREENE et al., 2006). Recentemente, na reunião do Subcomitê de Taxonomia da Leptospiraceae, realizada em Quito, Equador, em 2007, a espécie *L. interrogans* foi reclassificada em 13 novas espécies patogênicas: *L. alexanderi*, *L. alstonii*, *L. borgpeterseni*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. fainei*, *L. kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. terpstrae*, *L. weilii* e *L. wolfii* (ADLER e DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). Estudos envolvendo a hibridização de DNA sugerem que o gênero *Leptospira* deveria ser dividido em 20 espécies (CERQUEIRA e PICARDEAU, 2009). As leptospirosas podem ainda ser divididas de acordo com suas diferenças fenotípicas (ou antigênicas), denominados sorovares. Portanto, um determinado sorovar pode compreender mais de uma espécie de *Leptospira* spp.. Aproximadamente 260 diferentes sorovares patogênicos são reconhecidos atualmente, agrupados em 23 sorogrupos (ADLER e DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

Leptospirosas são bactérias flexíveis, com alta motilidade, que apresentam movimentos giratórios ao longo de seu próprio eixo. Suas características morfológicas incluem formato alongado, helicoidal, comprimento de 10 a 20 µm, diâmetro de 0,1 a 0,2 µm, dois endoflagelos periplasmáticos ao longo de sua extensão, e extremidades com formato de “gancho” (QUINN et al., 2005; GREENE et al., 2006; SLAMTI et al., 2011). Sua membrana plasmática dupla apresenta algumas particularidades em relação às outras espiroquetas invasivas, como a presença de lipopolissacarídeos e uma grande diversidade de proteínas transmembrana (HAAKE e MATSUNAGA, 2010).

Umidade e temperatura elevadas são condições essenciais para a sobrevivência da *Leptospira* spp. no ambiente. Temperatura de 28 a 30°C e pH

7,6, sob aerobiose, são condições ideais para seu crescimento e multiplicação (LEVETT, 2001). Sua membrana citoplasmática é muito sensível ao ressecamento, ocorrendo morte bacteriana em poucos minutos na ausência de água. No entanto, não é necessária a presença de corpos d'água para sua sobrevivência, pois substratos úmidos favorecem um ambiente adequado para sua manutenção (QUINN et al., 2005).

2.2 Aspectos gerais da leptospirose nos animais

2.2.1 Epidemiologia

2.2.1.1 Distribuição

A leptospirose é considerada uma enfermidade de distribuição mundial, ocorrendo com maior frequência nas regiões tropicais, onde as condições de umidade e temperatura contribuem para a sobrevivência da bactéria no ambiente (LEVETT, 2001). A enfermidade também é comum em países subdesenvolvidos e/ou em desenvolvimento, os quais possuem estrutura sanitária deficiente. No Brasil a leptospirose é considerada uma doença endêmica, e está presente em todo o território nacional.

2.2.1.2 Transmissão

A leptospirose apresenta uma característica sazonal, ocorrendo com maior frequência no verão, quando os índices pluviométricos e a temperatura são mais elevados, favorecendo a dispersão e a sobrevivência da *Leptospira* spp. no ambiente (ADLER e DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). A infecção ocorre principalmente de duas formas: contato direto com a urina ou tecidos de animais infectados, durante a sua manipulação; ou indiretamente pelo contato com água ou solo úmido previamente contaminados pela urina de um animal infectado (LEVETT, 2001). Outras formas de infecção incluem a via transplacentária (FELT et al., 2011), a transmissão venérea (HARRISON e FITZGERALD, 1988), e a inalação de aerossóis contendo gotículas de água

contaminada (LEVETT, 2001). Na leptospirose humana há evidências da eliminação de leptospiros pelo leite de mães lactantes (CHUNG et al., 1963; BOLIN e KOELLNER, 1988). A bactéria penetra ativamente ao entrar em contato com mucosas (principalmente oral e ocular) ou soluções de continuidade. Também pode ocorrer a penetração de leptospiros pela pele íntegra quando há exposição prolongada (LEVETT, 2001), como por exemplo, durante banhos em rios ou lagos.

2.2.1.3 Reservatórios

Os reservatórios de leptospirose incluem os animais susceptíveis à infecção pela *Leptospira* spp., capazes de eliminar a bactéria pela urina após o período de incubação. Diversas espécies, tanto domésticas como selvagens, podem atuar como reservatórios. Estes podem ser classificados como primários (ou de manutenção) e secundários (ou acidentais) (LEVETT, 2001; QUINN et al., 2005). Um reservatório primário é considerado altamente susceptível à infecção, sendo esta endêmica, ocorrendo principalmente pelo contato direto entre os animais durante a fase inicial da vida. Os sinais clínicos geralmente são brandos, e a prevalência da excreção renal aumenta com a idade. Os reservatórios primários são eficazes em manter a infecção renal e eliminar leptospiros pela urina, sendo os maiores responsáveis pela contaminação ambiental. Uma determinada espécie pode ser reservatório primário para um sorovar, mas acidental para outros. Neste caso, a infecção não é tão comum, e o aparecimento de lesões e sinais clínicos é mais frequente. As espécies de hospedeiros acidentais exibem baixa susceptibilidade à infecção, desenvolvem quadros clínicos mais graves, e são transmissores pouco eficientes.

A classe dos mamíferos é a mais importante e a mais estudada. Todas as espécies pertencentes a este grupo são consideradas potenciais reservatórios (FELT et al., 2011). Os répteis e anfíbios também podem se infectar e desenvolver a infecção renal (MINETTE, 1983; GRAVEKAMP et al., 1991; BISCOLA et al., 2011), mas os estudos direcionados para este grupo de animais são muito escassos. Pouco se sabe sobre o impacto da leptospirose

nos répteis e anfíbios, bem como a importância dos mesmos como fontes de infecção.

Os roedores de hábito sinantrópico são considerados os reservatórios mais importantes de *Leptospira* spp.. A espécie *Rattus norvegicus*, popularmente chamada de ratazana, é o reservatório primário de leptospiros pertencentes ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae e Ballum (LEVETT, 2001; RAHELINIRINA et al., 2010), capaz de manter a infecção e eliminar leptospiros pela urina por longo tempo. Outras espécies de roedores consideradas importantes reservatórios incluem o rato-de-telhado, também conhecido como rato-preto (*Rattus rattus*) e o camundongo (*Mus musculus*) (FAINE et al., 1999a; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002; RAHELINIRINA et al., 2010). Apesar do amplo conhecimento de que os roedores são transmissores da leptospirose em todo o mundo (WHO, 2003), ainda são escassos os estudos nessa área. Pouco se sabe sobre a importância das demais espécies de roedores, os sorovares mais frequentes, suas implicações na saúde pública, entre muitos outros aspectos.

Muitas espécies domésticas podem atuar como fontes de infecção, como os suínos, bovinos, ovinos, caprinos, equinos e cães. Diversos estudos realizados em vários países têm demonstrado a presença de leptospiros em tecidos e urina destes animais (LANGONI et al., 1999; ROCHA et al., 2004; SILVA et al., 2007; SOTO et al., 2007; BOMFIM et al., 2008; LILENBAUM et al., 2009; ROJAS et al., 2010). Os gatos domésticos são pouco susceptíveis à infecção, e possuem pouca importância como reservatórios de leptospirose. Em bovinos, ovinos e caprinos, o sorovar Hardjo é o mais comum, ocorrendo também com relativa frequência infecções pelos sorovares Pomona e Grippotyphosa (FAINE et al., 1999a; LEVETT, 2001; OLIVEIRA et al., 2001; QUINN et al., 2005; LILENBAUM et al., 2009; MARTINS et al., 2010; MELO et al., 2010; SEIXAS et al., 2011). Em equinos os sorovares Bratislava e Icterohaemorrhagiae são os mais comuns (LEES e GALES, 1994; WILLIAMS et al., 1994; LANGONI et al., 2004; ODONTSETSEG et al., 2005), enquanto que nos cães são os sorovares Canicola e Icterohaemorrhagiae (LEVETT, 2001; GREENE et al., 2006; ROACH et al., 2010). Há uma grande diversidade de sorovares importantes na infecção em suínos, como Pomona, Tarassovi,

Bratislava, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae e Canicola (FAINE et al., 1999a; LEVETT, 2001; SHIMABUKURO et al., 2003; SOTO et al., 2007).

É importante levar em consideração que a condição de reservatório (primário ou secundário) pode variar dependendo da região, assim como os sorovares que ocorrem nos mesmos. O estudo dos fatores que causam essas variações, as espécies mais importantes como reservatórios, e seus sorovares mais prevalentes são de grande importância para o conhecimento da epidemiologia da leptospirose em uma determinada região.

2.2.2 Patogenia

A infecção é basicamente dividida em duas fases: aguda e crônica (ou convalescente). Ao penetrar no organismo, as leptospiplas atingem a corrente sanguínea, e se multiplicam em diversos tecidos, principalmente pulmões, fígado e baço. A fase aguda, também chamada de leptospiremia, dura em média de uma a duas semanas, e se caracteriza pelo aparecimento de sinais clínicos. Após esta fase, os mecanismos imunológicos diminuem a quantidade de leptospiplas no organismo, havendo uma maior concentração nos tecidos onde a resposta inflamatória é menos acentuada, principalmente nos túbulos renais (LEVETT, 2001). Em seguida os sinais clínicos diminuem ou desaparecem, e a produção de anticorpos coincide com a soroconversão do animal (QUINN et al. 2005). Se a resposta imune não é suficiente para debelar a infecção, o quadro clínico é mais grave, havendo manifestações sistêmicas que podem levar a morte. Durante a fase crônica as leptospiplas permanecem principalmente nos rins, se aderem no epitélio dos túbulos renais (LEVETT, 2001), se multiplicam e são eliminadas pela urina.

2.2.3 Sinais clínicos

A infecção por *Leptospira* spp. pode apresentar comportamentos distintos (MARINHO et al., 2003) variando de assintomática até quadros clínicos graves, chegando à morte (FELT et al., 2011). Os roedores sinantrópicos, considerados os maiores reservatórios de *Leptospira* spp., não adoecem. As manifestações

clínicas geralmente estão associadas à lesões pulmonares, cardíacas, hepáticas e renais (MARINHO, 2008). Os sintomas mais comuns são febre, letargia, anorexia, pneumonia, icterícia, hematúria, hemorragias generalizadas e dores musculares (FAINE et al., 1999a; FELT et al., 2011). Nos equinos são comuns lesões no globo ocular, principalmente uveíte (WADA et al., 2003; BRANDES et al., 2007). Nos animais de produção, como bovinos, ovinos, caprinos e suínos, são muito comuns alterações relacionadas ao sistema reprodutor (LANGONI et al., 1999; QUINN et al., 2005), como aborto, nascimentos prematuros, nascimento de filhotes fracos, retenção de placenta, infertilidade, orquite, agalactia e mastite. Nestes animais se observa queda da produção, havendo diminuição da taxa de crescimento, do número de gestações, número de filhotes, e produção de leite.

2.2.4 Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial de leptospirose pode ser realizado por métodos diretos, que identificam a presença do agente etiológico, ou indiretos, que detectam anticorpos específicos contra leptospiros. Geralmente os métodos indiretos são mais utilizados, por serem rápidos, de baixo custo, e menos laboriosos (GROOMS e BOLIN, 2005). No caso da leptospirose, nos últimos anos as técnicas bio-moleculares têm sido cada vez mais recomendadas para o diagnóstico nos animais, e principalmente no homem.

Entre os métodos indiretos, também chamados de sorológicos, os mais utilizados são aqueles baseados na aglutinação de leptospiros. Seu uso teve início pouco depois da descoberta da doença, (MARTIN e PETTIT, 1918) e até hoje são amplamente utilizados (LEVETT, 2001). A Soroaglutinação Microscópica (SAM) é o método de referência para o diagnóstico de leptospirose (WHO, 2003), e consiste em adicionar ao soro uma suspensão de leptospiros vivos mantidas em meio de cultura. Se houver anticorpos anti-*Leptospira* spp. no soro testado, as bactérias se aglutinarão, formando complexos que podem ser observados em microscopia de campo escuro. Na maioria das vezes não ocorrem reações cruzadas entre diferentes sorovares,

havendo a necessidade de se utilizar baterias com diferentes sorovares para cada análise.

O ensaio imunoenzimático (ELISA) é outra técnica sorológica utilizada com frequência (MELO et al., 2010). Sua execução é mais fácil que a SAM, pois existem kits comerciais disponíveis. Em um estudo realizado por Cumberland et al. (2010) observou-se uma maior sensibilidade do ELISA em relação à SAM em diferentes fases da infecção no homem. Porém, esta técnica não é capaz de determinar qual o sorovar ou sorogrupo infectante. O ELISA não é recomendado como método exclusivo de diagnóstico para leptospirose, capaz de substituir a SAM (ADLER e DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). Além da SAM e do ELISA, poucos testes sorológicos têm sido empregados para o diagnóstico de leptospirose.

Existem vários métodos diretos para o diagnóstico de leptospirose. Um dos mais antigos é a pesquisa em campo escuro em fluidos corporais, como sangue, urina, derrames cavitários e fluido cerebrospinal. Esse material é submetido à microscopia de campo escuro, permitindo a visualização das leptospiros (GREENE et al., 2006). Porém, esta técnica apresenta pouca sensibilidade e especificidade (LEVETT, 2001), devido à intermitência com que as leptospiros são eliminadas pela urina, e à pequena carga bacteriana presente nos demais fluidos do organismo. Resultados negativos não significam ausência de *Leptospira* spp. no animal, e a análise de amostras pareadas é necessária.

O cultivo bacteriano é outra técnica muito utilizada, que consiste na inoculação de sangue ou tecido renal macerado em um tubo com meio de cultura (Fletcher ou EMJH) para que ocorra a multiplicação bacteriana (GREENE et al., 2006). Após incubação a 28°C, o material é observado em microscopia de campo escuro para a visualização de leptospiros. O período de incubação, segundo a literatura, é muito variável (de quatro semanas a seis meses). O cultivo bacteriano é uma técnica de baixa sensibilidade, laboriosa e demorada (BOQVIST et al., 2003; FEARNLEY et al., 2008; LILENBAUM et al., 2009), e tem sido cada vez menos utilizada para o diagnóstico de leptospirose. Tanto a pesquisa em campo escuro como o cultivo bacteriano se baseiam na morfologia das bactérias isoladas. Portanto, em casos de resultados positivos,

deve-se considerar a ocorrência de outros agentes da ordem Spirochaetales, não pertencentes ao gênero *Leptospira*.

Outros métodos diretos para o diagnóstico de leptospirose podem ser realizados pela coloração das leptospiros. Dessa forma é possível sua visualização em microscopia comum (LEVETT, 2001). A técnica de Warthin Starry e a técnica de Levaditti são as mais utilizadas, e utilizam nitrato de prata para corar leptospiros em amostras teciduais fixadas em formol. Outros métodos de coloração utilizados com menor frequência incluem a imunoistoquímica e a imunofluorescência.

As técnicas bio-moleculares, principalmente a PCR (reação em cadeia pela polimerase), têm sido muito utilizadas nos últimos anos para o diagnóstico de leptospirose (HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2011; MAYER-SCHOOL et al., 2011). Estas técnicas consistem basicamente na pesquisa do DNA bacteriano, que pode ser feita tanto em amostras biológicas, como em amostras de solo, água, entre outros. Um fragmento do DNA é amplificado muitas vezes por meio de reações específicas, e em seguida é submetido à eletroforese e visualizado macroscopicamente sob luz ultravioleta (CARVALHO et al., 2010). Embora as técnicas de PCR ainda sejam relativamente caras, seu resultado rápido e alta sensibilidade representam um fator importante para o diagnóstico de rotina na medicina veterinária.

2.2.5 Tratamento

O tratamento específico pode ser realizado por meio de antibióticos. A estreptomicina foi um dos primeiros medicamentos a ser utilizado (GIRIO et al., 2005). Atualmente os antimicrobianos empregados com maior frequência para o tratamento de leptospirose são a penicilina G cristalina, a ceftriaxona, a doxiciclina e a ampicilina (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Outros antibióticos incluem os aminoglicosídeos e macrolídeos (TRUCCOLO et al., 2002). Tratamento de suporte também deve ser realizado, de acordo com cada caso.

2.2.6 Prevenção

A prevenção da leptospirose deve se basear no controle de roedores, qualidade da água que os animais têm acesso, controle da aquisição de animais, na vacinação e na eliminação e/ou tratamento dos animais infectados (BARTHI et al., 2003; WHO, 2003; VIJAYACHARI, et al., 2008).

Para evitar a presença de roedores, deve-se armazenar adequadamente os alimentos; evitar o acúmulo de lixo, o qual pode fornecer alimento e abrigo para estes animais; e utilizar ratoeiras. O uso de gatos para o controle de roedores não é recomendado, pois essa prática aumenta os riscos de transmissão de toxoplasmose.

A água fornecida para o consumo dos animais deve ser limpa e de fonte segura. Água de lagos e rios são consideradas potenciais vias de transmissão da leptospirose. Deve-se drenar as áreas alagadas, ou evitar a formação das mesmas, pois podem transmitir a doença não somente pelo consumo, mas pelo contato com mucosas e soluções de continuidade.

A aquisição de animais é uma prática comum na criação de diversas espécies domésticas, como bovinos, ovinos, caprinos e equinos. A inclusão de um animal infectado em um rebanho saudável pode contribuir para a disseminação da enfermidade rapidamente, e tem sido considerada um importante fator para a ocorrência da leptospirose. O controle da procedência do animal, bem como a realização de exames antes de sua aquisição, são medidas que contribuem para a prevenção da leptospirose (MELO et al., 2010).

Os animais identificados como portadores de *Leptospira* spp. devem ser eliminados ou tratados, evitando a transmissão para outros animais. Produtos de aborto, como fetos e placentas, devem ser removidos e preferencialmente incinerados, pois este material pode representar uma via de transmissão no caso de abortos por leptospirose.

A vacina para leptospirose está disponível para algumas espécies domésticas, e seu uso contribui significativamente para a redução de animais soropositivos (GERRITSEN et al., 1994). Geralmente sua aplicação é feita anualmente. A imunização contra leptopiras é sorovar específica (LEVETT, 2001), havendo a necessidade da inclusão de diversos sorovares na

formulação da vacina, garantindo assim uma proteção eficaz. Isso nem sempre ocorre, pois muitos países em desenvolvimento não produzem vacinas, sendo necessária a utilização de produtos fabricados em outros países, os quais nem sempre possuem os mesmos sorovares como prioridade. Ao adquirir uma vacina, é importante se certificar quais sorovares estão inclusos em sua formulação, e se os mesmos ocorrem nos animais naquela região. Outro problema da vacinação é sua resposta imunológica fraca para alguns sorovares, apresentando pouca eficiência em alguns casos (FAINE, 1999b). Portanto a vacinação não deve ser adotada como única medida de prevenção (MELO et al., 2010).

2.3 Particularidades da leptospirose ovina

A infecção por *Leptospira* spp. em ovinos é muito comum em todo o mundo (MOTIE e MYERS, 1986; VERMUNT et al., 1994; LEON-VIZCAINO et al., 1997; ZAMORA et al., 1999; CICERONI et al., 2000; GIRIO et al., 2004) e, assim como os caprinos, estão entre as espécies domésticas menos susceptíveis à leptospirose (LEON-VIZCAINO et al., 1987). Alguns estudos têm apontado esta espécie como importantes reservatórios, capazes de manter a infecção e eliminar a bactéria no ambiente (SILVA et al., 2007; LILENBAUM et al., 2009). Em muitos casos, a infecção em rebanhos ovinos esta possivelmente associada à presença de bovinos, os quais são criados conjuntamente, e podem atuar como fontes de infecção para os ovinos (MELO et al., 2010).

Assim como na maioria das espécies, a infecção é subclínica. A ocorrência de sinais clínicos possui características específicas em dois grupos de animais: em indivíduos jovens a doença pode se manifestar de forma aguda e grave, apresentando icterícia, hematúria, hemoglobinúria, meningite e morte; e em fêmeas lactantes ou prenhes pode ocorrer agalactia e problemas reprodutivos (ELLIS, 1994; QUINN et al., 2005). O aborto é comum, principalmente nas duas últimas semanas de gestação (LEON-VIZCAINO et al., 1997; MELO et al., 2010). Outros sinais clínicos característicos da leptospirose ovina incluem febre alta, anemia hemolítica, irritabilidade,

ericação de pelos, diarreia e olhos vermelhos (DAVIDSON e HIRSH, 1980; VERMUNT et al., 1994). Segundo Melo et al. (2010), os sorovares mais associados à ocorrência de sinais clínicos em ovinos são Pomona, Ballum, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Sejroe e Hardjo.

2.4 Aspectos de saúde pública

A leptospirose possui grande importância no contexto de saúde pública. A infecção com frequência esta associada às condições precárias de higiene e infra-estrutura. O contato com água contaminada é principal via de transmissão da leptospirose humana (MERIEN et al., 2005), havendo um aumento do número de casos durante períodos de alto índice pluviométrico. A ocorrência de inundações, que obrigam as pessoas a se exporem por um longo período à água contaminada, é um fator importante e está frequentemente associada à ocorrência de surtos (GREENE et al., 2006).

A leptospirose também apresenta um caráter ocupacional (QUINN et al., 2005), pois profissionais que possuem frequente contato com animais apresentam maior risco de se infectarem, como por exemplo veterinários, zootecnistas, fazendeiros, funcionários de abatedouros, entre outros. Nestes casos a infecção ocorre geralmente de forma direta, ou seja, pelo contato com a urina e/ou tecidos de animais infectados. Por outro lado, a transmissão indireta é mais comum em profissionais que trabalham em redes de esgotos, mineradores, pescadores, soldados, agricultores, atletas de esportes aquáticos, entre outros. Nestes casos, o contato com água ou solo úmido contaminado é a principal via de transmissão (LEVETT, 2001; SEJVAR et al., 2003; RADL et al., 2011).

Atividades de recreação e o ecoturismo, quando praticados na água, representam um importante fator que predispõe a infecção por *Leptospira* spp.. Diversos surtos já foram relatados envolvendo estas atividades (LAU et al., 2010).

Assim como nos animais, o homem pode apresentar quadros clínicos graves quando infectado por *Leptospira* spp.. Porém, a maioria das infecções são auto-limitantes, e os sinais clínicos brandos (LEVETT, 2001), não havendo

necessidade de tratamento. Os sinais clínicos observados na leptospirose humana incluem febre, dores musculares (principalmente em panturrilhas), calafrios, icterícia, dificuldade respiratória, dores abdominais, sufusões em mucosas, dores de cabeça intensas, dores retro-orbitais, e fotofobia. Em casos mais graves podem ocorrer complicações como hemorragias generalizadas, falência renal e meningite asséptica (LEVETT, 2001). Ao contrário do que ocorre nos animais de produção, alterações relacionadas ao sistema reprodutor são raras. Poucos casos de aborto e morte fetal já foram documentados na leptospirose humana (CHUNG et al., 1963; COGHLAN e BAIN, 1969; FAINE et al., 1984)

O homem não é considerado uma importante fonte de infecção devido à pouca frequência com que são detectadas leptospiros em sua urina. Uma das hipóteses mais aceitas é que o baixo pH da urina humana limita a sobrevivência das leptospiros após sua excreção renal. Portanto, a transmissão direta entre pessoas, embora tenha sido documentada, é pouco frequente (LEVETT, 2001).

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 Determinar a prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* spp., seus títulos e sorovares mais frequentes em amostras de sangue de ovinos destinados ao abate;

3.2 Pesquisar a infecção por *Leptospira* spp. em amostras de fígado e rim de ovinos soropositivos para leptospirose;

3.3 Comparar o cultivo bacteriano, a técnica de Warthin Starry, a PCR convencional e a PCR quantitativa para a detecção de *Leptospira* spp. em amostras teciduais de ovinos soropositivos para leptospirose;

3.4 Quantificar a carga bacteriana em amostras de tecidos que apresentarem resultado positivo na PCR quantitativa.

Material e métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

Para determinar o número mínimo de animais que seriam necessários para o experimento (n) utilizou-se o programa Epi Info 3.5.1 (CDC, 2002). Considerou-se como referência uma soroprevalência de 18,68% em rebanhos ovinos no estado de São Paulo, segundo Da Silva et al. (2012), uma população de 253500 ovinos abatidos no Brasil, sendo 8300 no estado de São Paulo, nível de significância $\alpha = 5\%$, nível de confiança de 95% e margem de erro de 4%. Dessa forma obteve-se um “n” de 365 animais, ajustando-se o número final para 465 animais.

A colheita de material biológico foi feita em um abatedouro localizado no município de São Manuel, SP (22° 43' 51" S 48° 34' 15" O), que conta com Serviço de Inspeção Estadual – SISP, e que trabalha respeitando as normas vigentes no Serviço de Inspeção de acordo com a IN3-2000, pelo método de eletronarcose de abate.

As análises laboratoriais e estatísticas foram realizadas no Núcleo de Pesquisas em Zoonoses – NUPEZO, do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Campus de Botucatu, SP. Uma das técnicas de diagnóstico empregadas no estudo foi realizada pelo Serviço de Patologia do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Campus de Araçatuba, SP.

As amostras biológicas utilizadas, a sequência dos procedimentos, e as análises realizadas estão sintetizadas no fluxograma da figura 1.

4.2 Animais

Foram utilizados 465 animais da espécie ovina (*Ovis aries*), machos e fêmeas, de diferentes raças, sendo a grande maioria mestiça. As propriedades

de origem dos animais eram do estado de São Paulo (73,1%, n=340), Rio Grande do Sul (13,9%, n=65), Goiás (6,4%, n=30) e Mato Grosso do Sul (6,4%, n=30). Não foi possível determinar a procedência exata dos animais, pois em muitos casos a propriedade de origem não era a mesma da qual o animal havia sido encaminhado. Nestes casos, os animais eram adquiridos de vários locais, e permaneciam na propriedade por pouco tempo até serem vendidos, ou até mesmo eram revendidos diretamente, sem permanecerem na propriedade. Outro problema para identificar a procedência dos animais foi a falta de interesse dos proprietários em fornecer informações referentes à sua aquisição. Portanto, a procedência dos animais se limitou ao estado de origem.

4.3 Colheita e preparação das amostras

Foram realizadas 16 visitas ao abatedouro, durante o período de Novembro de 2009 a Outubro de 2010. Em cada visita, amostras de sangue e tecidos de aproximadamente 30 animais foram colhidas durante o processo de abate e limpeza das carcaças. Após a sangria, aproximadamente 5 mL de sangue foram coletados diretamente do animal (Figura 2), acondicionados em tubos de ensaio de vidro (10 mL) sem anticoagulante, devidamente identificados, e fechados com tampas de borracha. Em seguida, durante a evisceração, fragmentos de fígado e um dos rins foram coletados (Figura 3 a 5), armazenados em sacos plásticos e identificados. As amostras foram transportadas em caixa térmica para o NUPEZO.

O sangue foi centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos, o soro acondicionado em microtubos de plástico (INLAB®), e imediatamente submetidos à triagem sorológica. As amostras de fígado e rim permaneceram armazenadas em sacos plásticos refrigeradas a -4°C até o momento do cultivo bacteriano. Foram selecionados aleatoriamente 15 animais soronegativos para serem utilizados como controles negativos das técnicas de diagnóstico realizadas. As demais amostras de rim e fígado de animais soronegativos foram descartadas.

4.4 Sorologia

As amostras de soro foram testadas para anticorpos anti-*Leptospira* spp. pela técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM), segundo as normas do Ministério da Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1995). A análise sorológica foi utilizada como teste de triagem, e os animais soropositivos foram submetidos às demais técnicas de diagnóstico. Foi utilizada uma bateria de antígenos vivos, mantidas e repicadas semanalmente em meio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) (DIFCO Laboratories®, Detroit, USA), a 28°C, constituída de 25 sorovares e quatro sorovariantes do sorovar Hardjo: Australis, Bratislava, Autumnalis, Butembo, Castellonis, Bataviae, Canicola, Whitcombi, Cynopteri, Djasiman, Sentot, Gryppotyphosa, Hebdomadis, Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Panama, Pomona, Pyrogenes, Wolffi, Shermani, Tarassovi, Andamana, Patoc, Hardjo prajitno, Hardjo miniswajezak, Hardjo C.T.G. e Hardjo bovis. Cada amostra foi inicialmente diluída em solução salina tamponada de fosfatos (SST) pH 7,6 na diluição 1:50, adicionando-se 100 µL do soro a 4,9 mL da solução em tubos de ensaio de 10 mL. As mesmas foram transferidas utilizando-se uma micropipeta para uma microplaca de fundo chato, e dispostas horizontalmente em 29 orifícios contendo 50 µL de amostra cada. Em seguida 50 µL de cada um dos 29 antígenos foram adicionados na posição vertical às amostras de soro, totalizando 100 µL de material em cada orifício. SST pH 7,6 foi utilizado como controle negativo. As placas foram tampadas, levemente agitadas por 20 segundos e incubadas em estufa seca a 28°C durante uma hora.

Após a incubação, uma gota de cada orifício foi transferida para uma lâmina lisa de vidro utilizando-se uma alça bacteriológica, e a leitura realizada em microscopia ótica de campo escuro (Carl Zeiss®, Alemanha), com aumento de 100X. Foram consideradas positivas amostras que apresentaram 50% ou mais de leptospiros aglutinados. Posteriormente foi realizada uma nova análise das amostras positivas, com o objetivo de identificar seu título de anticorpos para o sorovar reagente. Para tanto, 100 µL das amostras previamente diluídas a 1:50 foram transferidas novamente para uma microplaca de fundo chato, e adicionados 50 µL de SST pH 7,6 em outros cinco orifícios dispostos

horizontalmente ao lado da amostra. Foi realizada a diluição na razão de dois, transferindo-se 50 µL do primeiro orifício para o segundo, homogeneizando-se com micropipeta, e transferindo 50 µL do segundo para o terceiro orifício, procedendo-se assim por diante, obtendo-se as diluições 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 e 1:1600. Em seguida foi adicionado somente o sorovar que apresentou reação positiva na diluição 1:100, transferindo-se 50 µL do mesmo para cada um dos seis orifícios contendo as amostras diluídas. O título final foi correspondente à maior diluição que apresentou resultado positivo, conforme descrito anteriormente (100, 200, 400, 800 ou 1600). No caso de amostras que apresentaram reação para mais de um sorovar, foi considerado como reagente somente aquele que apresentou maior título. Amostras positivas para uma ou mais das sorovariantes Hardjo bovis, Hardjo prajitno, Hardjo C.T.G. e Hardjo miniswajezak foram consideradas como reagentes para o sorovar Hardjo.

4.5 Cultivo bacteriano

Imediatamente após a triagem sorológica, amostras de rim e fígado de animais com título maior ou igual a 100, independente do sorovar reagente, foram submetidos ao cultivo bacteriano. A técnica foi realizada utilizando o método de diluição seriada, no qual as amostras são preparadas em diferentes diluições com o objetivo de aumentar as chances de isolamento (SULZER e JONES, 1978). O procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar (Veco®, VLFS-18). As superfícies dos tecidos foram esterilizadas com álcool iodado 70%, e em seguida mantidos sob luz ultravioleta durante 20 minutos, assim como o restante dos materiais e reagentes utilizados durante o procedimento, que foram todos processados sob condições de esterilidade.

Foram realizados cortes na superfície de ambos os tecidos, utilizando-se tesoura e pinças diferentes para cada órgão, e fragmentos do interior de cada tecido, com aproximadamente 1 grama, foram utilizados para o cultivo. Os fragmentos foram individualmente macerados em gral com pistilo, e em seguida adicionou-se 4 mL de solução diluente para leptospiros (500 mL de água, 12,5 mg de neomicina Vansil® e 12,5 mg de nitrofurazona Rioquímica®). Após homogeneização com pistilo, uma fração dessa mistura (1 mL) foi

armazenada em microtubos estéreis (Microtubes Axygen, INC. USA) a -80°C para posterior análise pela PCR, enquanto que o restante foi submetida ao cultivo bacteriano. Inoculou-se 0,5 mL da mistura em 4,5 mL de SST pH 7,6 estéril utilizando-se uma pipeta de vidro (2 mL) acoplada a um pipetador automático. Após homogeneização, 0,5 mL foram novamente transferidos para outro tubo contendo 4,5 mL de SST pH 7,6, homogeneizados e repetido o processo para um terceiro tubo. Dessa forma obtiveram-se as diluições 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} da mistura inicial de cada órgão. Cada diluição foi individualmente inoculada em tubos de vidro contendo 5 mL do meio semi-sólido Fletcher (DIFCO Laboratories®, Detroit, USA) enriquecido com soro de coelho inativado (55°C por 40 minutos) a 10%, e em seguida incubadas em estufa bacteriológica, a 28°C , durante 60 dias. Foi feita avaliação macroscópica semanal dos tubos para pesquisa de anel de Dinger. Em casos onde o mesmo foi observado, foi realizada uma avaliação em microscopia de campo escuro, analisando uma gota do meio de cultura entre lâmina e lamínula, com aumento de 400X, para confirmar a presença de leptospiros. Independente da presença ou não de anel de Dinger, a mesma análise microscópica foi feita aos 30 e 60 dias de incubação.

4.6 Extração de DNA

Para a extração de DNA foi utilizada a mistura previamente armazenada a -80°C . Esta apresentava uma consistência semi-sólida, e foi novamente macerada utilizando um triturador Bio Vortex (biospec). Em seguida 125 μL foram submetidos à extração e purificação de DNA, utilizando-se o kit de extração Illustra Tissue & Cells genomic Prep Mini Spin® kit, GE Healthcare, pelo método proporcional (scalable method), conforme instrução do fabricante. Após a extração, os tubos foram mantidos em refrigeração (4°C) por 24 horas para a estabilização do DNA, e analisados em NanoVue (GE-healthcare®). Como controle positivo da extração utilizou-se uma cepa de *Leptospira interrogans* sorovar Hardjo, mantida em meio EMJH, previamente centrifugada (3000 rpm por 10 minutos) e ressuspensa 2 vezes em SST pH 7,6 estéril. Água Miliq foi utilizada como controle negativo.

4.7 PCR (convencional)

A PCR (ou PCR convencional) foi realizada em microtubos livres de DNAses e RNAses (AXYGEN, INC. USA). Foram utilizados os *primers* Lep1 e Lep2, descritos por Merien et al. (1992), que correspondem a sequência de oligonucleotídeos 38-57 (5'GGCGGCGCGTCTTAAACATG3') e 348-368 (5'TTCCCCCATTGAGCAAGATT3'), da estrutura primária do gene 16 S rRNA da *Leptospira interrogans* sorovar Canicola. A amplificação do DNA foi realizada segundo Merien et al. (1992), com algumas modificações. Cada tubo de reação de 0,2 mL recebeu 2,5 µL de tampão de PCR (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,0), 0,75 µL de MgCl₂ (1,5 mM), 0,5 µL de *Taq platinum* polimerase (5U/µL) (Invitrogen), 0,5 µL de solução de dNTP (200µM) (Invitrogen), 0,5 µL de cada oligonucleotídeo (10 pmol) (IDT), 17,5 µL de água ultra pura (Gibco) e 2 µL de DNA obtido na extração. Os controles positivos e negativos utilizados foram os mesmos descritos na etapa de extração e purificação de DNA. A amplificação foi realizada no termociclador Mastercycler ep (Eppendorf), com ciclo consistindo de uma denaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguido por 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, anelamento a 63°C por 1,5 minutos, e uma extensão final a 72°C por 2 minutos para completar a extensão dos *amplicons*. Amostras positivas resultaram em um produto de 331 pares de bases.

4.8 Eletroforese

Para a visualização dos produtos obtidos, os mesmos foram submetidos à eletroforese horizontal. Uma alíquota de 10 µL de cada produto amplificado foram adicionados a 2 µL de BlueJuice™ (Invitrogen). Após homogeneização, esta solução foi submetida à eletroforese em gel de agarose 2,0% corado com Brometo de Etídio 10mg/mL (Gibco) em solução tampão TBE 1x (0,09 M Tris-HCl, 0,09 M de ácido bórico, 2 mM EDTA, pH 8,3), com corrida a 90 volts por aproximadamente 60 minutos (Electrophoresis Power Supply Model EPS 301, GE Healthcare). A visualização das bandas foi feita sob luz ultravioleta (296 nm) em transiluminador, e em seguida fotografadas e registradas utilizando o

sistema de fotodocumentação GelDOC[®]it, UVP, GelDoc-IT[™] (Imaging System), e o programa Vision Works[®] LS Software. A definição de resultados positivos foi baseada na presença de bandas no gel de agarose, tomando-se como referência o controle positivo.

4.9 PCR quantitativa

O DNA extraído das amostras foi submetido à PCR quantitativa (qPCR), para a determinação da carga bacteriana utilizando os mesmos *primers* direcionados para a região alvo descrita no item anterior, utilizando o sistema SYBR[®]Green, por meio do equipamento StepOne[™] Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems). Para a realização da curva-padrão foi utilizado o controle positivo da etapa de extração e purificação, em concentrações decrescentes na razão de 5 (10^0 , 2×10^{-1} , 4×10^{-2} , 8×10^{-3} , $1,6 \times 10^{-3}$, $3,2 \times 10^{-4}$ e $6,4 \times 10^{-5}$), partindo-se de uma concentração inicial de 40000 bactérias/ μ L, previamente calculada em microscopia de campo escuro.

Para o ensaio foi utilizado como volume final de reação 25 μ L, sendo 12,5 μ L de Power SYBR[®]Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1 μ L de cada *primer* (5 μ M), 2 μ L de DNA e 8,5 μ L de água MilliQ estéril. As seguintes condições foram utilizadas: 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 s, 60°C por 1 minuto e uma etapa para a curva de dissociação de 95°C por 15 s, 60°C por 1 minuto e 95°C por 15 s. O sinal de fluorescência foi adquirido nos passos de extensão do ciclo de amplificação. Todas as amostras foram processadas em duplicata. A quantidade de DNA presente nas amostras foi expressa em relação à curva-padrão que foi adicionada em cada ensaio, sendo os valores analisados pelo software do equipamento. A quantificação bacteriana foi correspondente à quantificação do DNA.

4.10 Técnica de Warthin Starry

Após a triagem sorológica, fragmentos representativos de fígado e rim foram submetidos à fixação em formalina tamponada a 10% por 48 horas, em seguida lavadas em água corrente por uma hora e armazenadas em álcool

etílico (70%) até o momento do processamento histológico. As amostras foram processadas segundo protocolo histotécnico padrão, em séries crescentes de álcool etílico e xileno e após, incluídas em parafina histológica. Os blocos foram cortados em micrótomo automático (Leica®), produzindo secções com espessura de 4 µm. Os cortes foram desparafinizados, reidratados e corados pela técnica de Warthin Starry (WS), segundo Prophet et al. (1992).

Inicialmente as lâminas foram imersas em solução acidulada de nitrato de prata a 1% e incubadas em estufa aquecida a 43°C por 30 minutos. Em seguida a revelação da coloração ocorreu utilizando-se solução gelatinosa de nitrato de prata 2% e pirocatecol, até que o tecido atingisse a tonalidade amarronzada. As lâminas foram então lavadas em água corrente por 5 minutos, desidratadas em séries crescentes de álcool etílico e xileno, e montadas com resina sintética (Permout®) e lamínula. A visualização das leptospiros ocorreu sob objetiva 100X, utilizando-se imersão em óleo. Foram consideradas positivas amostras onde se observou estruturas helicoidais coradas em marrom escuro.

4.11 Análise estatística

A associação entre os resultados da SAM, PCRc, qPCR, cultivo microbiológico e a técnica de WS foi verificada pelo teste de McNemar. O tratamento estatístico relacionado à performance dos resultados obtidos pela PCR, qPCR, cultivo bacteriano e a técnica de WS foram calculados tendo a detecção de anticorpos como padrão-ouro, utilizando-se a planilha descrita por Mackinnon (2000). O mesmo teste foi realizado separadamente para avaliar a performance da PCR, cultivo bacteriano e técnica de WS utilizando a qPCR como padrão-ouro. As correlações entre os títulos de anticorpos na SAM (independente do sorovar reagente, específico para os sorovares mais frequentes, e específico para as sorovariantes mais frequentes) e as concentrações de DNA de *Leptospira* spp. determinadas pela qPCR em amostras de rim e fígado, foram analisadas pelo teste de Spearman (r). Para as outras análises estatísticas foram utilizados os programas Epi Info 3.5.1 e BioEstat 5.0, utilizando-se $\alpha = 5\%$ (AYRES et al., 2007).

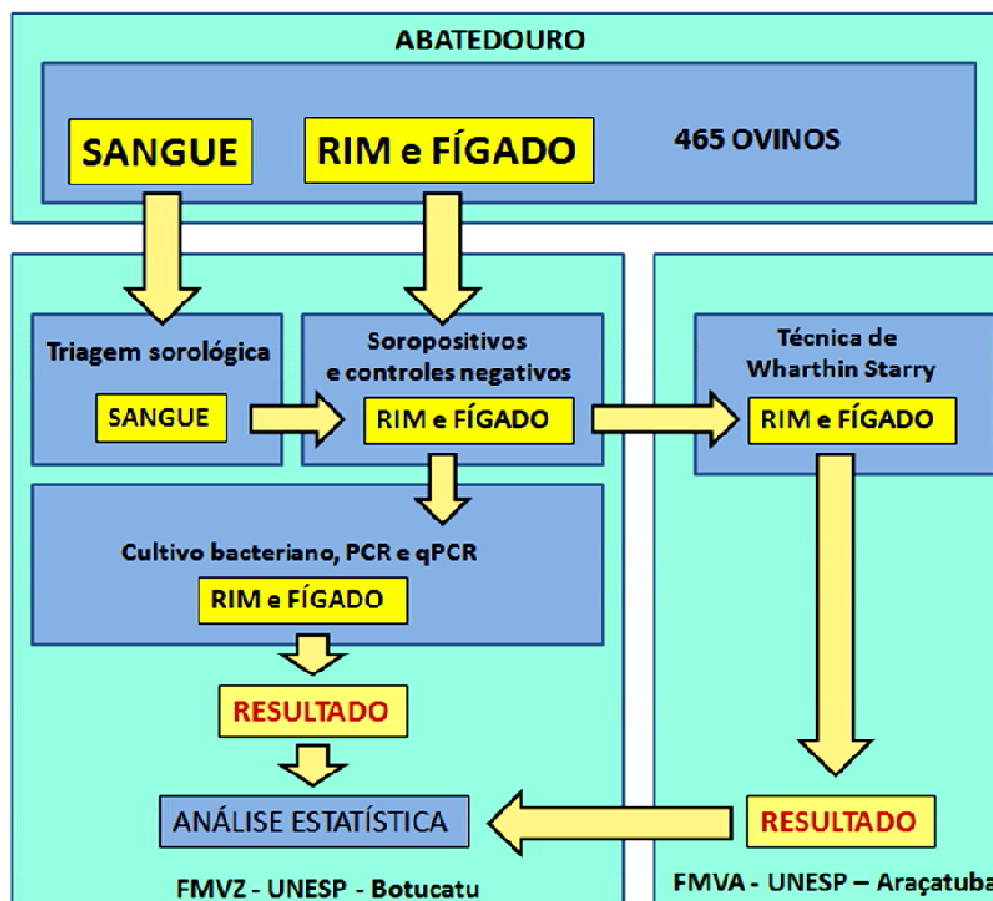


FIGURA 1. Fluxograma ilustrando as amostras biológicas utilizadas, a sequência dos procedimentos, e as análises realizadas para a detecção de *Leptospira* spp. em ovinos. Botucatu, 2011.



FIGURA 2. Coleta de sangue após sangria de ovino proveniente de abatedouro localizado em São Manuel, SP. Botucatu, 2011.



FIGURA 3. Etapa de evisceração de carcaças de ovinos em abatedouro localizado em São Manuel, SP. Botucatu, 2011.



FIGURAS 4 e 5. Coleta de rim e fragmento de fígado durante processo de evisceração de ovino em abatedouro localizado em São Manuel, SP. Botucatu, 2011.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1 Sorologia

No exame sorológico (SAM) 21 animais foram positivos, correspondente a uma soroprevalência de 4,5% (IC 95% 3,0-6,8%). Os sorovares reagentes foram Hardjo (n=12), Hebdomadis (n=5), Sentot (n=2), Wolfii (n=1) e Shermani (n=1). Os títulos apresentados foram 100 (n=10), 200 (n=2), 400 (n=6) e 1600 (n=3). Entre os 11 animais que apresentaram títulos maiores que 100, 10 reagiram para o sorovar Hardjo. Estes resultados estão sumarizados na tabela 1.

5.2 Cultivo bacteriano

No cultivo bacteriano nenhum animal apresentou resultado positivo, tanto em amostras de fígado como de rins (Tabela 1). Quando a SAM foi considerada a prova-padrão ouro, a análise estatística revelou os seguintes resultados: $\chi^2 = 19,05$; $P = 0,0000$; $\kappa = 0,0000$ (0,0000-0,0000); sensibilidade = 0,0%; especificidade = 100,0%; VPP = indeterminado; VPN = 41,7% (Tabela 2). Quando a qPCR foi considerada a prova-padrão ouro, a análise estatística revelou os seguintes resultados: $\chi^2 = 9,09$; $P = 0,0026$; $\kappa = 0,0000$ (0,0000-0,0000); sensibilidade = 0,0%; especificidade = 100,0%; VPP = indeterminado; VPN = 69,4% (Tabela 3).

5.3 Técnica de Warthin Starry

Na técnica de WS foram positivas amostras renais de quatro animais. Nenhum animal apresentou resultado positivo em amostras de fígado pela técnica de WS. Estes animais apresentaram sorologia positiva para o sorovar Hardjo com os títulos 400 (n=3) e 1600 (n=1). Nenhum animal com sorologia negativa foi positivo na técnica de WS. Estes quatro animais também apresentaram resultado positivo na PCR e na qPCR em amostra de rim (Tabela 1).

Quando a SAM foi considerada a prova-padrão ouro, a análise estatística revelou os seguintes resultados: $\chi^2 = 15,06$; $P = 0,0001$; $\kappa = 0,1639$ (0,0055-0,3223); sensibilidade = 19,1%; especificidade = 100,0%; VPP = 100,0%; VPN = 46,9% (Tabela 2). Quando a qPCR foi considerada a prova-padrão ouro, a análise estatística revelou os seguintes resultados: $\chi^2 = 5,14$; $P = 0,0233$; $\kappa = 0,4425$ (0,1347-0,7502); sensibilidade = 36,4%; especificidade = 100,0%; VPP = 100,0%; VPN = 78,1% (Tabela 3).

5.4 PCR

Na PCR convencional foram positivas amostras renais de seis animais. Nenhum animal apresentou resultado positivo em amostras de fígado pela PCR. Estes animais apresentaram sorologia positiva para o sorovar Hardjo com os seguintes títulos: 200 (n=1), 400 (n=4) e 1600 (n=1). Nenhum animal com sorologia negativa foi positivo na PCR. Estes seis animais também apresentaram resultado positivo na qPCR em amostras de rim (Tabela 1).

Quando a SAM foi considerada a prova-padrão ouro, a análise estatística revelou os seguintes resultados: $\chi^2 = 13,07$; $P = 0,0003$; $\kappa = 0,0025$ (0,0978-0,5830); sensibilidade = 28,6%; especificidade = 100,0%; VPP = 100,0%; VPN = 50,0% (Tabela 2). Quando a qPCR foi considerada a prova-padrão ouro, a análise estatística revelou os seguintes resultados: $\chi^2 = 3,2$; $P = 0,0736$; $\kappa = 0,6250$ (0,3422-0,9078); sensibilidade = 54,6%; especificidade = 100,0%; VPP = 100,0%; VPN = 83,3% (Tabela 3).

5.5 qPCR

Na qPCR foram positivos 11 animais, 9 soropositivos e 2 soronegativos. Entre os soropositivos, 3 animais apresentaram resultado positivo em amostras de fígado, enquanto que o restante dos animais foi positivo na qPCR em amostras de rim (n=8). Nenhum animal foi positivo para ambas as amostras teciduais. Os animais soropositivos foram reagentes para os sorovares Hardjo (n=8) com títulos 200 (n=2), 400 (n=5) e 1600 (n=1), e para o sorovar

Hebdomadis (n=1) com título 100 UI. O único animal reagente para o sorovar Hebdomadis foi positivo na qPCR na amostra de fígado (Tabela 1).

Quando a SAM foi considerada a prova-padrão ouro, a análise estatística revelou os seguintes resultados: $\chi^2 = 5,79$; $P = 0,0162$; $\kappa = 0,2696$ (0,0096-0,5295); sensibilidade = 42,9%; especificidade = 85,7%; VPP = 81,8%; VPN = 52,0% (Tabela 2). Os valores da qPCR obtidas de amostras de rim apresentaram correlação positiva com os títulos da SAM em animais reagentes para as sorovariantes, Hardjo Prajitno e Hardjo C.T.G. (Tabela 4).

A quantificação bacteriana das amostras positivas na qPCR variou de 1,7 a 8,2 bactérias/ μ L (bact/ μ L) em amostras de fígado, resultando em uma mediana (Md) de 4,32 bact/ μ L, enquanto que no rim variou de e de 5,2 a 98,3 bact/ μ L (Md de 36,67 bact/ μ L). As amostras de rim provenientes dos dois animais soronegativos apresentaram altas concentrações quando comparadas com as amostras de animais soropositivos (39,5 e 98,3 bact/ μ L) (Tabela 1 e 5).

TABELA 1. Resultado da SAM, PCR, qPCR, cultivo bacteriano e técnica de WS de ovinos soropositivos para leptospirose, provenientes de abatedouro do município de São Manuel, SP. Botucatu, 2011.

Animal	Título / Sorovar ^a	PCR ^b	qPCR ^c (bact/μL)*	Cultivo bacteriano	Técnica de WS ^d
A-112	100 - Hardjo (C.T.G.)	-	-	-	-
A-150	1600 - Hardjo (C.T.G.)	+ R	+ R (33,7)	-	+ R
A-171	400 - Hardjo (pra.)	+ R	+ R (61,9)	-	+ R
A-173	400 - Hardjo (C.T.G. e pra.)	+ R	+ R (13,5)	-	+ R
A-174	400 - Hardjo (C.T.G.)	+ R	+ R (61,8)	-	+ R
A-213	1600 - Hardjo (pra.)	-	-	-	-
A-215	400 - Hardjo (C.T.G.)	+ R	+ R (28,8)	-	-
A-229	200 - Hardjo (C.T.G.)	-	+ F (4,3)	-	-
A-237	100 - Hardjo (pra.)	-	-	-	-
A-245	400 - Hardjo (C.T.G.)	-	+ F (8,2)	-	-
A-247	200 - Hardjo (C.T.G. e pra.)	+ R	+ R (5,2)	-	-
A-256	100 - Hebdomadis	-	-	-	-
A-259	100 - Shermani	-	-	-	-
A-323	100 - Hebdomadis	-	+ F (1,7)	-	-
A-344	100 - Hebdomadis	-	-	-	-
A-346	100 - Wolfii	-	-	-	-
A-350	100 - Hebdomadis	-	-	-	-
A-414	400 - Hebdomadis	-	-	-	-
A-460	100 - Sentot	-	-	-	-
A-461	100 - Sentot	-	-	-	-
A-467	1600 - Hardjo (C.T.G. e pra.)	-	-	-	-

^a Soroaglutinação microscópica (SAM)

^b PCR convencional

^c qPCR

^d Técnica de Warthin Starry

C.T.G.: Hardjo C.T.G.

pra.: Hardjo prajitno

R: amostra de rim

F: amostra de fígado

*bacteria/μL

TABELA 2. Associação entre os resultados da SAM e do cultivo bacteriano, técnica de WS, PCR e qPCR para a detecção de *Leptospira* spp. em amostras de rim e fígado de ovinos soropositivos para leptospirose, provenientes de abatedouro do município de São Manuel, SP. Botucatu, 2011.

SAM	Cultivo bacteriano ^a			Técnica de WS ^b			PCR ^c			qPCR ^d		
	Negativo	Positivo	Total	Negativo	Positivo	Total	Negativo	Positivo	Total	Negativo	Positivo	Total
Não reagente	15	0	15	15	0	15	15	0	15	13	2	15
Reagente	21	0	21	17	4	21	15	6	21	12	9	21
Total	36	0	36	32	4	36	30	6	36	25	11	36

Teste de McNemar

^a $\chi^2 = 19,05$; valor de $P = 0,0000$; $\kappa = 0,0000$ (0,0000-0,0000); $S = 0,0\%$; $E = 100,0\%$; $VPP =$ indeterminado; $VPN = 41,7\%$

^b $\chi^2 = 15,06$; valor de $P = 0,0001$; $\kappa = 0,1639$ (0,0055-0,3223); $S = 19,1\%$; $E = 100,0\%$; $VPP = 100,0\%$; $VPN = 46,9\%$

^c $\chi^2 = 13,07$; valor de $P = 0,0003$; $\kappa = 0,2500$ (0,0978-0,5830); $S = 28,6\%$; $E = 100,0\%$; $VPP = 100,0\%$; $VPN = 50,0\%$

^d $\chi^2 = 5,79$; valor de $P = 0,0162$; $\kappa = 0,2696$ (0,0096-0,5295); $S = 42,9\%$; $E = 85,7\%$; $VPP = 81,8\%$; $VPN = 52,0\%$

S: sensibilidade

E: especificidade

VPP: valor preditivo positivo

VPN: valor preditivo negativo

TABELA 3. Associação entre a qPCR e cultivo bacteriano, técnica de WS e PCR para a detecção de *Leptospira* spp. em amostras de rim e fígado de ovinos soropositivos para leptospirose, provenientes de abatedouro do município de São Manuel, SP. Botucatu, 2011.

qPCR	Cultivo bacteriano ^a			Técnica de WS ^b			PCR ^c		
	Negativo	Positivo	Total	Negativo	Positivo	Total	Negativo	Positivo	Total
Negativo	25	0	25	25	0	25	25	0	25
Positivo	11	0	11	7	4	11	5	6	11
Total	36	0	36	32	4	36	30	6	36

Teste de McNemar

^a $\chi^2 = 9,09$; valor de $P = 0,0026$; $\kappa = 0,0000$ (0,0000-0,0000); $S = 0,0\%$; $E = 100,0\%$; $VPP =$ indeterminado; $VPN = 69,4\%$

^b $\chi^2 = 5,14$; valor de $P = 0,0233$; $\kappa = 0,4425$ (0,1347-0,7502); $S = 36,4\%$; $E = 100,0\%$; $VPP = 100,0\%$; $VPN = 78,1\%$

^c $\chi^2 = 3,20$; valor de $P = 0,0736$; $\kappa = 0,6250$ (0,3422-0,9078); $S = 54,6\%$; $E = 100,0\%$; $VPP = 100,0\%$; $VPN = 83,3\%$

S: sensibilidade

E: especificidade

VPP: valor preditivo positivo

VPN: valor preditivo negativo

TABELA 4. Correlação entre os títulos da SAM, independente do sorovar, específico para o sorovar, e específico para a sorovariante mais frequente, e os resultados da PCR quantitativa para a detecção de DNA de *Leptospira* spp. em amostras de rim e fígado de ovinos provenientes de abatedouro do município de São Manuel, SP. Botucatu, 2011.

Par de variáveis	Coeficiente <i>r</i>	Valor de <i>P</i> ($\alpha=5\%$)	Interpretação
SAM x qPCR – rim	0,3162	0,0602	Correlação moderada
SAM x qPCR – fígado	0,2296	0,1779	Correlação fraca
SAM (Hardjo) x qPCR – fígado	0,1809	0,2910	Correlação fraca
SAM (Hardjo) x qPCR – rim	0,4367	0,0077	Correlação moderada
SAM (CTG) x qPCR – rim	0,5228	0,0104	Correlação moderada
SAM (CTG) x qPCR – fígado	0,3214	0,1347	Correlação moderada
SAM (PRA) x qPCR – rim	0,3042	0,1799	Correlação moderada
SAM (PRA) x qPCR – fígado	-	-	-

SAM: soroaglutinação microscópica

qPCR: PCR quantitativo

SAM (CTG): amostras reagentes para a sorovariante Hardjo C.T.G, excluindo-se as demais amostras reagentes

SAM (PRA): amostras reagentes para a sorovariante Hardjo prajitno, excluindo-se as demais amostras reagentes

qPCR - rim: resultados das amostras de rim pela qPCR

qPCR - fígado: resultados das amostras de fígado pela qPCR

TABELA 5. Mediana (Md), percentil 25% (P25) e 75% (P75) da carga bacteriana (bactérias/ μ L) aferida pela qPCR em amostras de rim e fígado de ovinos soropositivos para leptospirose provenientes de abatedouro do município de São Manuel, SP. Botucatu, 2011.

Orgão	Mediana	Percentil 25%	Percentil 75%
Rim	36,67	25,04	61,89
Fígado	4,32	3,05	6,29

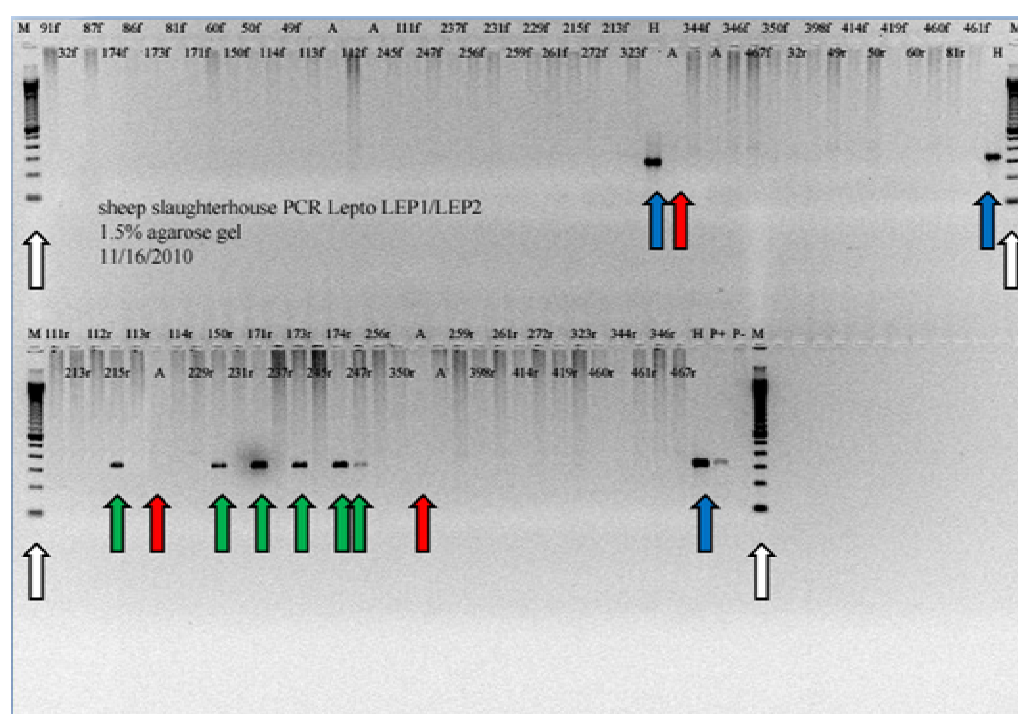


FIGURA 6. Eletroforese horizontal de amostras renais e hepáticas de ovinos submetidas à PCR, ilustrando as bandas de amostras positivas (setas verdes), controles positivos (setas azuis), controles negativos (setas vermelhas) e os marcadores moleculares (*ladder*) (setas brancas). Botucatu, 2011.

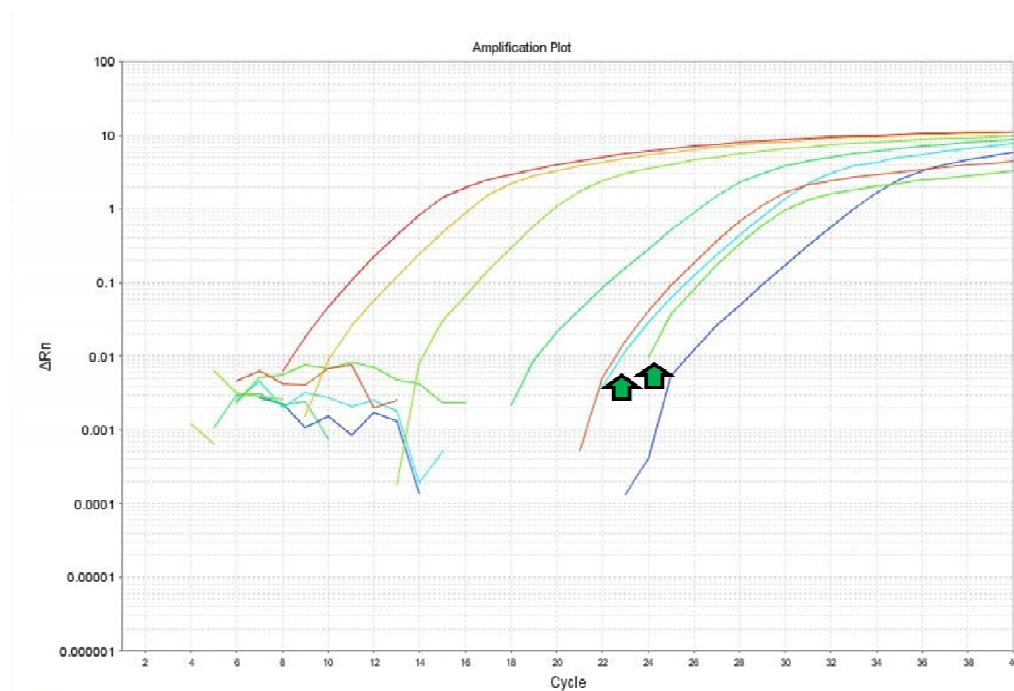


FIGURA 7. Gráfico ilustrando a intensidade de fluorescência emitida por duas amostras renais de ovinos positivas (setas verdes) pela PCR quantitativa, de acordo com o ciclo de amplificação. As demais amostras são referentes à curva-padrão. Botucatu, 2011.

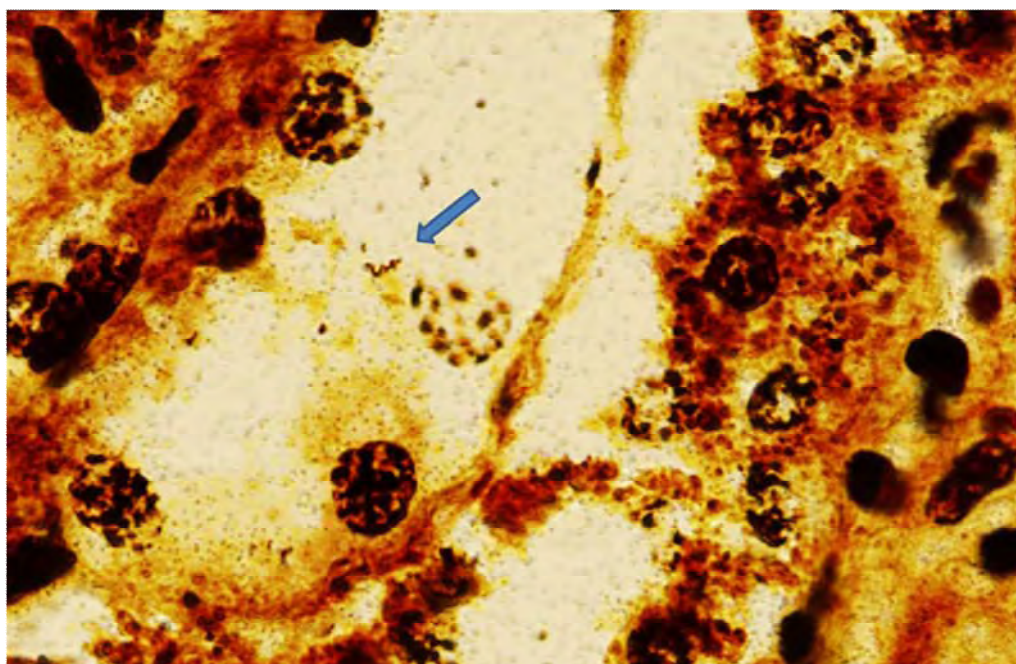


FIGURA 8. Imagem de microscopia óptica comum (100x) de tecido renal de ovino soropositivo pra leptospirose, corado pela técnica de Warthin Starry, ilustrando estrutura compatível com leptospira (seta azul). Botucatu, 2011.

Discussão

6. DISCUSSÃO

A prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. nos animais estudados pode ser considerada baixa. No Brasil a infecção em ovinos foi descrita pela primeira vez por Santa Rosa e Pestana de Castro (1963), no estado de São Paulo. Os autores verificaram uma soroprevalência de 34%, onde os sorovares prevalentes foram Canicola e Icterohaemorrhagiae. Desde então, diversos inquéritos sorológicos têm demonstrado a ampla distribuição de leptospiros em rebanhos ovinos em várias regiões do Brasil. Um estudo realizado em 846 ovinos no estado de São Paulo revelou uma soroprevalência de 8,6% (BARBUDO FILHO et al., 1999). No entanto, estudos realizados no Brasil indicam resultado de prevalência superiores às encontradas no presente estudo e por Barbudo et al. (1999). Outro estudo realizado no estado de São Paulo avaliou a presença de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em amostras de sangue de 356 ovinos, obtendo-se prevalência de 44,65% pela SAM (LANGONI et al., 1995). No Piauí, Carvalho et al. (2011) estudaram amostras de sangue de 119 ovinos provenientes de um abatedouro, e obtiveram soroprevalência de 28,6%. No estado do Rio de Janeiro, Martins et al. (2011) estudaram diferentes rebanhos de ovinos, totalizando 308 animais, os quais apresentaram soroprevalência de 47,4%. Nas regiões Sudeste e Sudoeste do Estado do Rio Grande do Sul, Herrmann et al. (2004) observaram uma soroprevalência de 34,26% em 1360 ovinos provenientes de 136 fazendas.

Porém, prevalências baixas também são descritas, inclusive em outros países. No Chile Zamora et al. (1999) detectaram 5,7% de ovinos soropositivos entre os 629 estudados, provenientes de 11 propriedades. Na Itália Ciceroni et al. (2000) estudaram amostras de sangue de 313 ovinos, e obtiveram 6,1% de positividade, utilizando uma grande quantidade (28) de sorovares na SAM, assim como o presente estudo. No Distrito Federal, Brasil, Seixas et al. (2011) obtiveram soroprevalência de 3,0% em 157 ovinos estudados. Em Trinidad e Tobago, um estudo com 222 ovinos detectou 5,0% de animais soropositivos (SUEPAUL et al., 2011). Portanto, rebanhos ovinos podem apresentar taxas de infecção extremamente diferentes, dependendo da região e das condições em que cada estudo foi realizado.

A comparação de prevalências de diferentes estudos envolvendo inquéritos sorológicos não é conveniente, pois diversos fatores estão relacionados com a ocorrência da enfermidade em cada local, com as técnicas utilizadas e, principalmente, porque a soroprevalência depende da quantidade de sorovares utilizados na SAM. No presente estudo não foi possível determinar os fatores envolvidos na baixa soroprevalência apresentada.

Embora a maioria dos animais tenha apresentado reação positiva para o sorovar Hardjo, não se pode afirmar que este foi o sorovar infectante, pois reações cruzadas podem ocorrer, especialmente com sorovares pertencentes ao mesmo sorogrupo (GROOMS e BOLIN, 2005). Portanto, pode-se dizer que a maioria dos animais estudados, em algum momento, se infectou com leptospiplas pertencentes ao sorogrupo Sejroe, no qual o sorovar Hardjo está incluso. Diversos estudos têm apontado este sorogrupo como o mais prevalente em rebanhos ovinos (MOTIE e MYERS, 1986; HERRMANN et al., 2004; LILENBAUM et al., 2009; SEIXAS et al., 2011), bem como sua relação com problemas reprodutivos (CLARK, 1994; MARTINS et al., 2011). Cousins et al. (1989) observaram que ovinos sem contato prévio com bovinos eram capazes de manter a infecção pelo sorovar Hardjo por mais de 11 meses, demonstrando a importância da espécie ovina como reservatório para este sorovar. Segundo Lilenbaum et al. (2009), o sorogrupo Sejroe é responsável por um grande número de infecções em rebanhos de ovinos, causando desordens reprodutivas e infecção renal crônica. No presente estudo, os animais reagentes para o sorogrupo Sejroe, bem como seu rebanho de origem, apresentavam risco de desenvolver leptospirose.

Os sorogrupos Pomona, Icterohamorrhagiae e Autumnalis também são descritos com frequência na espécie ovina (ZAMORA et al., 1999; FAVERO et al., 2002; GIRIO et al., 2004; SUEPAUL et al., 2011), mas não foram detectados no presente estudo. O segundo sorogrupo mais frequente nos animais estudados foi o Hebdomadis (n=5). Este sorogrupo raramente é descrito em ovinos no Brasil, e pouco se sabe sobre seu impacto nesta espécie. Hathaway et al. (1982) estudaram amostras de sangue de 3722 ovinos provenientes da Inglaterra e do País de Gales, e observaram que 2,0% dos animais apresentavam reação positiva para o sorovar Hebdomadis. Ellis et al. (1983) associaram a infecção por este sorogrupo à nascimentos

prematturos, abortos e morte em ovinos. No presente estudo os cinco animais reagentes eram provenientes de três propriedades diferentes, indicando que não se trata de um determinado rebanho que apresentou esta particularidade, mas sim que existe uma pequena proporção de animais em diferentes regiões que tiveram contato com este sorogrupo.

Embora a SAM ainda seja considerada o método de diagnóstico de eleição para leptospirose (WHO, 2003), assim como qualquer método sorológico, ela não é capaz de detectar a presença de leptospiiras. Animais com sorologia positiva possuem anticorpos, indicando que em algum momento de sua vida tiveram contato com o agente etiológico da enfermidade. Portanto, deve-se analisar e interpretar com cuidado a análise estatística quando a SAM for considerada como prova padrão ouro, e não subestimar os valores de sensibilidade e VPP, uma vez que as demais técnicas de diagnóstico analisadas consistem em métodos diretos, que dependem da presença do DNA bacteriano. Estes valores devem ser analisados conjuntamente, e não como valores absolutos de cada técnica, uma vez que o objetivo do trabalho foi comparar diferentes métodos diagnósticos.

Por outro lado, quando a qPCR foi considerada a prova padrão ouro, os valores de sensibilidade, VPP e VPN foram mais elevados, pois esta se comparando uma técnica direta (qPCR) com outras que também são diretas (cultivo bacteriano, PCR e técnica de WS). O motivo pelo qual a qPCR também foi utilizada como prova padrão ouro na análise estatística é pela sua alta sensibilidade, não somente para o diagnóstico de leptospirose no homem (MERIEN et al., 2005), mas de diversas enfermidades de caráter infeccioso e parasitário (BELANGERO, 2010).

O cultivo bacteriano não apresentou resultado positivo para os animais estudados. Diversos estudos demonstram resultados similares, onde a taxa de isolamento é muito baixa ou nula. Azevedo et al. (2004) estudaram 80 ovinos provenientes de um abatedouro localizado na região Nordeste do Brasil, e obtiveram quatro animais positivos no cultivo bacteriano de amostras de rins. Na Espanha Leon-Vizcaino et al. (1987) isolaram leptospiiras em seis surtos de abortos entre os 25 estudados, utilizando tecidos e fluidos de fetos ovinos e caprinos. No estado do Rio de Janeiro, Lilenbaum et al. (2009) realizaram cultivo bacteriano em amostras de urina de 40 ovinos soropositivos,

redundando todos negativos. Estudos em outras espécies animais demonstram resultados semelhantes. Fearnley et al. (2008) pesquisaram amostras de rim de 204 suínos com histórico de problemas reprodutivos, sendo 180 soropositivos pela SAM e 25 pela qPCR, e não obtiveram resultado positivo pelo cultivo bacteriano. Harkin et al. (2003) estudaram amostras de urina de 500 cães, e obtiveram resultados positivos em 41 casos pela PCR e nenhum pelo cultivo bacteriano. Estes estudos demonstram a baixa taxa de isolamento de leptospiros pelo cultivo bacteriano, bem como sua inferioridade em relação a PCR.

O cultivo de leptospiros é considerado uma técnica de baixa sensibilidade, laboriosa e demorada (BOQVIST et al., 2003; GROOMS e BOLIN, 2005; FEARNLEY et al., 2008; LILENBAUM et al., 2009). Quando isoladas *in vivo*, leptospiros apresentam uma baixa taxa de crescimento (HEALTH et al., 1965), e até mesmo baixos níveis de contaminação por outras bactérias podem comprometer sua multiplicação. Adler et al. (1986) constaram que o maior problema no cultivo de leptospiros é a contaminação por outros micro-organismos, especialmente quando se utilizam tecidos que não foram coletados de forma asséptica. Outros fatores, ainda não esclarecidos, estão envolvidos na dificuldade em se obter cultivos positivos. Amostras de urina positivas em campo escuro, demonstrando a presença de espiroquetídeos no material, podem apresentar resultado negativo no cultivo bacteriano (LILENBAUM et al., 2008; LILENBAUM et al., 2009). Portanto, esta técnica não é recomendada para diagnóstico rápido ou estudos epidemiológicos (BOQVIST et al., 2003; AHMED et al., 2009). Os resultados confirmam a baixa sensibilidade do cultivo bacteriano para a detecção de leptospiros, corroborando com dados presentes na literatura.

Com frequência se utiliza o antimicrobiano 5-fluorouracil para o cultivo de leptospiros, com o objetivo de reduzir os riscos de contaminação. No presente estudo esta droga não foi utilizada porque, segundo Ris (1974), no meio Fletcher o 5-fluorouracil perde seu efeito inibidor. Segundo o autor, seu uso é recomendado quando se utilizam outros meio de cultura. São escassos os estudos relacionados à eficiência de antimicrobianos no cultivo de leptospiros, e não se pode afirmar que o uso do 5-fluorouracil poderia resultar em cultivos positivos no presente estudo. Outro fator a ser considerado é a presença de

leptospiras mortas no tecido, pois neste caso o cultivo resultaria negativo, e as análises de PCR positivas. Porém, a técnica de WS revelou a presença de espiroquetas íntegras no tecido renal de quatro animais, indicando que, pelo menos nestes casos, é pouco provável que as leptospiras estivessem mortas.

Os resultados obtidos indicam que o cultivo bacteriano apresenta boa especificidade e VPN moderado, mas baixa sensibilidade para a detecção de *Leptospira* spp. em amostras teciduais de ovinos. Esta técnica deve ser recomendada para estudos focados no isolamento *in vitro* de leptospiras vivas e, segundo Wuthiekanun et al. (2007), possui papel importante em estudos epidemiológicos, pois permite estudar a patogênese da leptospira isolada. O cultivo bacteriano não é recomendado para o diagnóstico rápido de leptospirose na prática veterinária, pois além da sua baixa sensibilidade, é longo o tempo necessário para obter seu resultado.

A técnica de WS apresentou resultados superiores ao cultivo bacteriano, mas inferiores aos demais métodos. Quatro animais foram positivos em amostras de rim, demonstrando que esta técnica é capaz de detectar leptospiras em amostras teciduais de ovinos. Poucos estudos foram realizados utilizando esta técnica para a pesquisa de *Leptospira* spp., especialmente em ovinos, e seu uso é mais frequente para a detecção de *Helicobacter pylori* (KIM et al., 2009), uma espiroqueta semelhante à *Leptospira* spp..

Um importante estudo foi realizado recentemente por Carvalho et al. (2011) no Piauí. Os autores estudaram 119 ovinos provenientes de um abatedouro, e obtiveram 8 animais positivos pela técnica de WS em amostras de rins. A proporção de animais positivos pela técnica de WS e positivos na sorologia (8/43, 18,9%) foi semelhante aos descritos no presente trabalho (4/21, 19,0%).

Em equinos a técnica de WS já foi utilizada em diversos tipos de tecidos, como rim, placenta, fígado e cordão umbilical, obtendo-se resultados positivos (HODGIN et al., 1989; POONACHA et al., 1993; WADA et al., 2003; SEBASTIAN et al., 2005; LÉON et al., 2006). A pesquisa em amostras de rins de cães também já foi realizada com sucesso em estudos descrevendo lesões renais por *Leptospira* spp. (SCANZIANI et al., 1995; ORTEGA-PACHECO et al., 2008). No homem, a detecção de leptospiras pela técnica de WS já foi

realizada em amostras do epitélio intestinal de um paciente com diagnóstico de colite crônica (DE BRITO et al., 1996).

Chappel et al. (1992) compararam diferentes técnicas de diagnóstico para leptospirose em amostras de rim de 368 suínos, e encontraram resultados positivos em 9 animais pela técnica de WS e 27 positivos pelo cultivo. Neste estudo os autores descreveram a baixa sensibilidade da técnica de WS (20%) em relação aos demais métodos utilizados. Hunter et al. (1987) obtiveram resultados similares aos de Chappel et al. (1992) em um estudo com suínos na África do Sul. Em 20 amostras de rim positivas pelo cultivo bacteriano, nenhuma foi positiva pela técnica de WS. Estes resultados indicam que novos estudos devem ser realizados para se determinar a eficiência da técnica de WS em relação ao cultivo bacteriano, considerando-se os resultados conflitantes de acordo com a literatura consultada.

A técnica de WS apresenta como principal vantagem a visualização direta do agente, permitindo determinar sua distribuição e localização no tecido estudado (GROOMS e BOLIN, 2005). Por outro lado, sua realização é laboriosa, os procedimentos e a leitura das lâminas devem ser feitos por pessoas treinadas e experientes, e são necessários tecidos do animal, o que dificulta sua aplicação no diagnóstico *ante mortem*, bem como sua utilização em larga escala.

Quando a SAM foi considerada como prova-padrão ouro, a sensibilidade da técnica de WS foi baixa (19,1%). Mas quando comparada com a qPCR, sua sensibilidade foi mais elevada (36,4%). Os resultados indicam que a técnica de WS apresenta alta especificidade (100,0%), alto VPP (100,0%), e VPN de moderado (46,9%) a alto (78,1%), dependendo da análise, podendo ser utilizada para a detecção de leptospirose em amostras de rim de ovinos. Devido às desvantagens já mencionadas, seu uso é recomendado para o diagnóstico *post mortem*, especialmente quando se deseja visualizar a bactéria no tecido estudado.

No presente estudo a PCR apresentou resultados superiores ao cultivo bacteriano e a técnica de WS, mas sensibilidade inferior à qPCR. A PCR vem sendo utilizada para o diagnóstico de enfermidades infecciosas há alguns anos, apresentando muitas vantagens em relação a outros métodos tradicionais. Sua eficiência em detectar DNA de *Leptospira* spp. em urina de animais infectados

é comprovada desde 1989 (VAN EYES et al., 1989). Segundo Hernández-Rodríguez et al. (2011), o diagnóstico de leptospirose pela PCR é rápido, preciso e confiável. Vários protocolos já foram testados em diferentes espécies de animais (WOODWARD, 2001), como bovinos, cães, suínos, roedores e morcegos (COX et al., 2005; FEARNLEY et al., 2008; ROJAS et al., 2010; FELT et al., 2011; MAYER-SCHOOL et al., 2011). Apesar das diferentes técnicas utilizadas, e das diferentes espécies animais estudadas, a PCR tem demonstrado alta sensibilidade na detecção de DNA de *Leptospira* spp. em diversos tipos de amostras biológicas, como sangue, plasma, soro, urina, rim, humor aquoso, derrames cavitários e sêmen (MERIEN et al., 1993; MERIEN et al., 1995; HEINEMANN et al., 2000; LEVETT et al., 2005; FEARNLEY et al., 2008; LILENBAUM et al., 2009; BOURHY et al., 2011; PINNA et al., 2011). Alguns estudos compararam a PCR com outras técnicas tradicionais para o diagnóstico de leptospirose, como o campo escuro e o cultivo bacteriano, e, na grande maioria dos casos, a PCR apresenta resultados superiores. (WAGENAAR et al., 2000; HARKIN et al., 2003; LILENBAUM et al., 2008; LILEMBAUM et al., 2009; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2011).

O uso da PCR para pesquisa de DNA de leptospirose em amostras teciduais de ovinos é muito rara. Alguns autores, em estudos semelhantes, descreveram a importância desta espécie como reservatórios de *Leptospira* spp.. Um importante trabalho foi realizado por Lilenbaum et al. (2009) no estado do Rio de Janeiro. Utilizando a técnica de PCR, cultivo bacteriano e campo escuro em amostras de urina, os autores identificaram a infecção por *Leptospira* spp. em 6 ovinos entre os 40 soropositivos amostrados, obtendo maior positividade pela técnica de PCR. Os mesmos autores encontraram resultados similares ao utilizar sêmen e secreções vaginais ao invés de urina, confirmando a maior sensibilidade da PCR em relação ao cultivo e ao campo escuro (LILENBAUM et al., 2008). Na região Sul do Brasil, Silva et al. (2007) estudaram 44 ovinos provenientes de um abatedouro, e analisaram amostras de rins de 10 animais, obtendo resultado positivo em uma amostra pela PCR e pela cultura bacteriana. Felt et al. (2011) estudaram amostras de rim de 25 ovelhas no Egito pela PCR e cultivo bacteriano, mas não encontraram resultado positivo.

O custo relativamente elevado e a necessidade de técnicos experientes é um obstáculo para a implementação da PCR na maioria dos laboratórios de diagnóstico. Nos últimos anos seu uso tem se tornado mais frequente, e sua popularização demonstra que no futuro seu custo será mais acessível, assim como mais profissionais estarão especializados nesta técnica. Outro problema apresentado pelas técnicas de PCR é que não identificam microorganismos vivos, podendo apresentar resultado positivo em amostras contendo somente o DNA do agente etiológico estudado.

Assim como na técnica de WS, a PCR apresentou melhor sensibilidade quando a qPCR foi utilizada como padrão ouro (54,6%), alta especificidade (100,0%), VPP alto (100,0%) e VPN de moderado a alto (50,0 e 83,3%), demonstrando a eficiência desta técnica na detecção de *Leptospira* spp. em amostras de rim de ovinos. Seu uso é recomendado para estudos epidemiológicos direcionados para a identificação de animais infectados, bem como para o diagnóstico de leptospirose em ovinos.

A qPCR apresentou a maior sensibilidade em relação aos demais métodos utilizados. Seu uso é mais recente no diagnóstico de leptospirose do que a PCR convencional. É considerada uma técnica de alta sensibilidade e especificidade, que possibilita também a quantificação do DNA na amostra estudada (KALTENBOECK e WANG, 2005). Diversos estudos têm comprovado sua alta eficiência na detecção de leptospirosas (LEVETT et al., 2005; AHMED et al., 2009; STODDARD et al., 2009; BEDIR et al., 2010). A qPCR é mais utilizada para o diagnóstico de leptospirose em humanos (MERIEN et al., 2005; SEGURA et al., 2005; BOURHY et al., 2011; THAIPADUNPANIT et al., 2011), sendo os estudos em animais escassos.

Não há descrições sobre o uso da qPCR para a detecção de leptospirosas em ovinos. Trabalhos conduzidos em diversas espécies domésticas têm comprovado sua alta sensibilidade em relação a outras técnicas. Um estudo realizado em 204 suínos utilizou o cultivo bacteriano e a qPCR para a pesquisa de leptospirosas em amostras de rim, obtendo-se resultado positivo em 25 animais pela qPCR e nenhum pelo cultivo bacteriano (FEARNLEY et al., 2008). Rojas et al. (2010) pesquisaram leptospirosas na urina de 525 cães em Dublin, Irlanda, e obtiveram resultados positivos em 37 (7,05%) animais pela qPCR. A pesquisa de leptospirosas pela qPCR também têm sido realizada em diferentes

espécies de animais selvagens, como roedores e morcegos (COX et al., 2005; RAHELINIRINA et al., 2010).

No presente estudo três animais soropositivos, cujas amostras de fígado apresentaram baixa carga bacteriana (1,7, 8,2 e 4,3 bact/ μ L), foram positivos somente na qPCR. Além disso, amostras de rim de dois animais soronegativos apresentaram resultado positivo por esta técnica, o que pode ser justificado pela fase aguda da infecção nas quais os animais se encontravam. Durante esta fase é comum o resultado sorológico negativo, pois o organismo ainda não produziu anticorpos (MERIEN et al., 1995; LEVETT, 2001; MERIEN et al., 2005). Além disso, a fase aguda se caracteriza por uma grande quantidade de bactérias circulantes em diversos tecidos e, conforme os resultados da qPCR, estes dois animais apresentaram carga bacteriana elevada (39,5 e 98,3 bact/ μ L) quando comparados com os animais soropositivos. Devido ao resultado sorológico negativo destes dois animais com diagnóstico precoce, a especificidade da qPCR foi inferior ao das demais técnicas quando a SAM foi considerada como prova padrão ouro. Conforme discutido anteriormente, os animais soronegativos positivos na qPCR provavelmente se encontravam na fase aguda da infecção, sem tempo hábil para soroconversão, não se tratando de resultados falso positivo. Desta forma, a especificidade da qPCR não deve ser subestimada.

Os resultados indicam que a qPCR possui alta sensibilidade, especificidade, VPP e VPN quando comparada com as demais técnicas, e seu uso é indicado para a detecção de DNA de *Leptospira* spp. em amostras de rim e fígado de ovinos. A correlação positiva entre a carga bacteriana de rim de animais soropositivos e os títulos obtidos na SAM para animais reagentes para as sorovariantes Hardjo C.T.G. e Hardjo prajitno, indicam que quanto maior o título para estas sorovariedades, maior a carga de leptospiros no rim.

A menor concentração de DNA bacteriano foi de 1700 bact/ μ L em uma amostra de fígado. Embora diferentes qPCRs tenham sido realizadas para o diagnóstico de leptospirose, alguns estudos tem demonstrado que esta técnica é capaz de detectar quantidades ainda menores de DNA bacteriano (FEARNLEY et al., 2008; AHMED et al., 2009; BOURHY et al., 2011). Não é possível afirmar se este é o limiar mínimo de detecção da qPCR utilizada neste estudo.

Em todas as técnicas o rim apresentou maior positividade do que o fígado, o que pode ser justificado pela quantificação bacteriana apresentada pela qPCR, pois amostras positivas de rim possuíam valores muito superiores (36,67 bact/ μ L) aos de fígado (4,32 bact/ μ L). Durante a fase crônica da infecção o rim é o tecido de eleição para a colonização por leptospiros. No presente estudo optou-se por trabalhar com amostras de fígado porque este órgão é com frequência afetado durante a fase de leptospiremia (ADLER e DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010); e devido à ausência de estudos comparando diferentes tecidos. Marinho et al., (2006) observaram resultados similares em um estudo com hamsters experimentalmente infectados por *Leptospira interrogans* sorovar canicola. Pode-se concluir que o rim apresenta resultados superiores ao fígado para a pesquisa de *Leptospira* spp., independente da técnica utilizada.

Os *primers* utilizados tanto na PCR como na qPCR foram desenvolvidos por Merien et al. (1992), e estão entre os mais utilizados para este propósito (LEVETT, 2001). Conforme descrito pelos autores, estes *primers* não são capazes de diferenciar leptospiros patogênicos de não patogênicos, o que poderia representar um problema segundo alguns estudos. Mas, segundo Merien et al. (2005), na prática este problema é mínimo, se não nulo, quando se utilizam amostras clínicas, como sangue, urina e tecidos. No presente estudo foram utilizadas amostras de rim e fígado, e a infecção destes tecidos por leptospiros não patogênicos é muito improvável. O mesmo pode ser dito em relação à contaminação destes tecidos durante sua manipulação no abatedouro. Porém, ao se utilizar amostras ambientais, como solo e água, estes *primers* podem detectar leptospiros não patogênicos e, dependendo do objetivo do estudo, seu uso não é recomendado.

A SAM é considerada o método de diagnóstico de referência para leptospirose (WHO, 2003). Animais e humanos apresentando títulos de anticorpos elevados, ou aumento de título em amostras pareadas, são sugestivos de infecção ativa (LEVETT, 2001). Mas durante a fase aguda da infecção, quando se iniciam os sinais clínicos, é comum a SAM apresentar resultado negativo, pois o organismo ainda não produziu anticorpos específicos (MERIEN et al., 2005). Em um estudo realizado por Cumberland et al. (1999), a SAM apresentou sensibilidade de apenas 30% durante a fase aguda da

infecção em pacientes humanos. Na maioria dos casos, é durante esta fase que o proprietário/paciente procura atendimento médico. Portanto, pacientes com leptospirose aguda podem vir a óbito antes de apresentar sorologia positiva (BROWN et al., 1995; CUMBERLAND et al., 1999). Outros problemas apresentados pela SAM incluem a necessidade de se utilizar baterias com diferentes sorovares, sua manutenção, os riscos aos quais os profissionais se expõem ao lidar com esse material, subjetividade da interpretação de resultados positivos, e falta de consenso sobre qual título deve ser considerado como indicativo de infecção (CUMBERLAND et al., 1999; GROOMS e BOLIN, 2005; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2011).

Os métodos de diagnóstico diretos apresentam vantagens em relação ao diagnóstico sorológico, pois detectam o agente, e não anticorpos. No presente estudo a qPCR foi a técnica mais eficiente para detectar leptospirosas em amostras teciduais de ovinos. Porém, a qPCR é uma técnica menos acessível e de custo mais elevado do que a PCR. Entre os métodos diagnósticos de leptospirose testados no presente estudo, recomenda-se a qPCR e, como segunda opção, a PCR convencional.

No homem tanto a PCR como a qPCR tem sido recomendadas para o diagnóstico precoce de leptospirose utilizando amostras de sangue, plasma e soro (MÉRIEN et al., 1995; LEVETT et al., 2005; MÉRIEN et al., 2005; OOTEMAN et al., 2006; BOURHY et al., 2011). Novos estudos devem ser realizados utilizando diferentes tipos de amostra, com o objetivo de contribuir para o diagnóstico *ante mortem*, não somente de ovinos, mas também de outras espécies domésticas e selvagens.

O diagnóstico final de leptospirose deve ser embasado na associação de provas diagnósticas, considerando-se ainda os aspectos clínicos e epidemiológicos. Dessa forma, diminuem-se os riscos de diagnósticos falsos negativos.

Os resultados do presente estudo confirmam a presença de leptospirosas em amostras teciduais de ovinos. Com uma exceção, todos os animais positivos pelos métodos empregados foram soropositivos para o sorogrupo Sejroe, indicando que este foi o sorogrupo infectante.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

7.1 Bactérias do gênero *Leptospira* spp. foram detectadas em amostras de rim e fígado de ovinos;

7.2 O sorogrupo Sejroe foi o mais frequente nos animais estudados;

7.3 O rim apresentou maior positividade e maior carga bacteriana do que o fígado em ovinos infectados por *Leptospira* spp.;

7.4 A PCR quantitativa apresentou maior eficiência do que o cultivo bacteriano, técnica de Warthin Starry e PCR convencional para a detecção de *Leptospira* spp. em amostras de rim e fígado de ovinos soropositivos;

7.5 Há uma correlação positiva entre os títulos da Soroaglutinação Microscópica e a carga bacteriana de leptospiros em amostras de rim de ovinos soropositivos para as sorovariantes Hardjo C.T.G. e Hardjo prajitno;

7.6 A presença de espiroquetas, confirmada pela técnica de Warthin Starry, em amostras apresentando DNA de bactérias do gênero *Leptospira* spp. indica que os ovinos podem atuar como carreadores deste agente;

Referências bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet. Microbiol.*, v.140, p.287-296, 2010.
- ADLER, B.; FAINE, S.; CHRISTOPHER, W.L.; CHAPPEL, R.J. Development of an improved selective medium for isolation of leptospires from clinical material. *Vet. Microbiol.*, v.12, n.4, p.377-81, 1986.
- AHMED, A.; ENGELBERTS, M.F.M.; BOER, K.R.; AHMED, N.; HARTSKEERL, R.A. Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic *Leptospira* species in clinical materials. *PLoS ONE*, v.4, n.9, p.e7093, 2009.
- AYRES, M.; AYRES JR, M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. BioEstat 5.0. *Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Belém: Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá. 2007, 364p.
- AZEVEDO, S.S.; ALVES, C.J.; ANDRADE, J.S.L.; SANTOS, F.A.; FREITAS, T.D.; BATISTA, C.S.A. Isolation of *Leptospira* spp. from kidneys of sheep at slaughter. *Cienc. Rural*, v.71, n.3, p.383-385, 2004.
- BARBUDO FILHO, J.; GIRIO, R.J.S.; MATHIAS, L.A.; OLIVEIRA, A.V.; MARINHO, M. Pesquisa de anticorpos contra *Leptospira interrogans* em soros de ovinos do estado de São Paulo. Avaliação do sorotipo *jequitai* de *Leptospira biflexa* como antígeno de triagem sorológica. *ARS Veterinária*, v.15, n.1, p.26-32, 1999.
- BEDIR, O.; KILIC, A.; ATABEK, E.; KUSKUCU, A.M.; TURHAN, V.; BASUSTAOGU, A.C. Simultaneous detection and differentiation of pathogenic and nonpathogenic *Leptospira* spp. by multiplex real time PCR (TaqMan) assay. *Pol. J. Microbiol.*, v.53, n.3, p.167-173, 2010.
- BELANGERO, S.I.N. PCR em tempo real. In: CARVALHO, C.V.; RICCI, G.; AFFONSO, R. *Guia de práticas em biologia molecular*. São Caetano do Sul: Yendis, 2010. chap. 4, p.61-98.

BISCOLA, N.P.; FORNAZARI, F.; SAAD, E.; RICHINI-PEREIRA, V.B.; CAMPAGNER, M.V.; LANGONI, H.; BARRAVIERA, B.; JUNIOR, R.S.F. Serological investigation and PCR in detection of pathogenic leptospires in snakes. *Pesquisa Vet. Brasil*, v.31, n.9, p.806-811, 2011.

BOLIN, C.A.; KOELLNER, P. Human-to-human transmission of *Leptospira interrogans* by milk. *J. Infect. Dis.*, v.158, p.246-247, 1988.

BOMFIM, M.R.Q.; BARBOSA-STANCIOLI, E.F.; KOURY, M.C. Detection of pathogenic leptospires in urine from naturally infected cattle by nested PCR. *Vet. J.*, v.178, p.251-256, 2008.

BOQVIST, S.; MONTGOMERY, J.M.; HURST, M.; HO THI VIET THU; OLSSON ENGVALL, E.; GUNNARSSON, A.; MAGNUSSON, U. *Leptospira* in slaughtered fattening pigs in southern Vietnam: presence of the bacteria in kidneys and association with morphological findings. *Vet. Microbiol.*, v.93, p.361-368, 2003.

BOURHY, P.; BREMONT, S.; ZININI, F.; GIRY, C.; PICARDEAU, M. Comparison of real time PCR assay for detection pathogenic *Leptospira* spp. on blood and identification of variations in target sequences. *J. Clin. Microbiol.*, v.49, n.6, p.2154-2160, 2011.

BRANDES, K.; WOLLANKE, B.; NIEDERMAIER, G.; BREM, S.; GERHARDS, H. Recurrent uveitis in horses: vitreal examinations with ultrastructural detection of leptospires. *J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med.*, v.54, n.5, p.270-275, 2007.

BRITO, T.; SANDOVAL, M.P.; SILVA, A.G.; SAAD, R.C.; COLAIACOVO, W. Intestinal spirochetosis: first cases reported in Brazil and the use of immunohistochemistry as an aid in histopathological diagnosis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.38, n.1, p.45-53, 1996.

BROWN, P.D.; GRAVEKAMP, C.; CARRINGTON, D.G.; VAN DE KEMP, H.; HARTSKEERL, R.A.; EDWARDS, C.N.; EVERARD, C.O.R.; TERPSTRA, W.J.; LEVETT, P.N. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of Leptospirosis. *J. Med. Microbiol.*, v.43, p.110-114, 1995.

CARVALHO, C.V.; RICCI, G.; LEAL, M.F.; AFFONSO, R. Reação em cadeia da polimerase (PCR) e eletroforese. In: CARVALHO, C.V.; RICCI, G.; AFFONSO, R. *Guia de práticas em biologia molecular*. São Caetano do Sul: Yendis, 2010. chap.3, p.35-60.

CARVALHO, S.M.; GONÇALVES, L.M.F.; MACEDO, N.A.; GOTO, H.; SILVA, S.M.M.S.; MINEIRO, A.L.B.B.; KANASHIRO, E.H.Y.; COSTA, F.A.L. Infecção por leptospiros em ovinos e caracterização da resposta inflamatória renal. *Pesq. Vet. Bras.*, v.31, n.8, p.637-642, 2011.

CDC. Center for Disease Control. Epi Info. 2002. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/epiinfo/ei2002.htm>>. Acesso em: 14 ago. 2009

CERQUEIRA, G.M., PICARDEAU, M. A century of *Leptospira* strain typing. *Infect. Genet. Evol.*, v.9, p.760-768. 2009.

CHAPPEL, R.J.; PRIME, R.W.; MILLAR, B.D.; MEAD, L.J.; JONES, R.T.; ADLER, B. Comparison diagnostic procedures for porcine leptospirosis. *Vet. Microbiol.*, v.30, p.151-163, 1992.

CHUNG, H.L.; TS'AO, W.C.; MO, P.S.; YEN, C. Transplacental or congenital infection of leptospirosis. *Chin. Med. J.*, v.82, p.777-782, 1963.

CICERONI, L.; LOMBARDO, D.; PINTO, A.; CIARROCCHI, S.; SIMEONI, J. Prevalence of antibodies to *Leptospira* serovars in sheep and goats in Alto Adige-South Tyrol. *J. Vet. Med.*, v.47, p.217-223, 2000.

CLARK, A.M. *Leptospira hardjo* infection in sheep. *Vet. Rec.*, v.134, n.11, p.283, 1994.

COGHLAN, J.D.; BAIN, A.D. Leptospirosis in human pregnancy followed by death of the foetus. *BMJ*, v.1, p.228-230.

COUSINS, D.V.; ELLIS, T.M.; PARKINSON, J.; MCGLASHAN, C.H. Evidence of sheep as maintenance host for *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*. *Vet. Rec.*, v.124, n.5, p.123-124, 1983.

COX, T.E.; SMYTHE, L.D.; LEUNG, L.K. Flying foxes as carriers of pathogenic *Leptospira* species. *J. Wild. Dis.*, v.41, n.4, p.753-757, 2005.

CUMBERLAND, P.C.; EVERARD, C.O.R.; LEVETT, P.N. Assessment of the efficacy of the IgM enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and microscopic agglutination test (MAT) in the diagnosis of acute Leptospirosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.61, p.630-634, 1999.

DA SILVA R.C., COSTA V.M., SHIMABUKURO F.H., RICHINI-PEREIRA V.B., MENOZZI B.D., LANGONI H. *Leptospira* spp. isolation and molecular detection in Brazilian slaughtered sheep flocks. *Pesq. Vet. Bras.*, 2012. no prelo.

DAVIDSON, J.N.; HIRSH, D.C. Leptospirosis in lambs. *JAVMA*, v.176, n.2, p.124-125, 1994.

ELLIS, W.A. Leptospirosis as cause of reproductive failure. *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.*, v.10, n.3, p.463-478, 1994.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. Clinical leptospirosis in animals. In:____. *Leptospira spp. and leptospirosis*. Melbourne: MediSei, 1999a. chap.13, p.113.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. Prevention of leptospirosis – Part 2. In:____. *Leptospira spp. and leptospirosis*. Melbourne: MediSei, 1999b. chap.17, p.151.

FAINE, S.; ADLER, B.; CHRISTOPHER, W.; VALENTINE, R. Fatal congenital human leptospirosis. *Zentbl. Bakteriол.*, v.257, p.548, 1984.

FAVERO, A.C.M.; PINHEIRO, S.R.; VASCONCELLOS, S.A.; MORAIS, Z.M.; FERREIRA, F.; NETO, J.S.F. Sorovares de leptospiras predominantes em exames sorológicos de bubalinos, ovinos, caprinos, equinos, suínos e cães de diversos estados brasileiros. *Cienc. Rural*, v.32, n.4, p.613-619, 2002.

FEARNLEY, C.; WAKELEY, P.R.; GALLEG0-BELTRAN, J.; DALLEY, C.; WILLIAMSON, S.; GAUDIE, C.; WOODWARD, M.J. The development of a real

time PCR to detect pathogenic *Leptospira* species in kidney tissue. *Res. Vet. Sci.*, v.85, p.8-16, 2008.

FELT, S.A.; WASFY, M.O.; EL-TRASS, W.F.; SAMIR, A.; RAHAMAN, B.A.; BOSHRA, M.; PARKER, T.M.; HATEM, M.E.; EL-BASSIOUNY, A.A.; MURRAY, C.K.; PIMENTEL, G. Cross species surveillance of *Leptospira* in domestic and peri-domestic animals in Mahalla city, Gharbeya Governorate, Egypt. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.84, n.3, p.420-425, 2011.

GERRITSEN, M.J.; KOOPMANS, M.J.; PETERSE, D.; OLYHOEK, T. Sheep as maintenance host for *Leptospira interrogans* serovar Hardjo subtype Hardjobovis. *Am. J. Vet. Res.*, v.55, n.9, p.1232-1237, 1994.

GIRIO, R.J.S.; PEREIRA, F.L.G.; FILHO, M.M.; MATHIAS, L.A.; HERREIRA, R.C.P.; ALESSI, A.C.; GIRIO, T.M.S. Pesquisa de anticorpos contra *Leptospira* spp. em animais silvestres e em estado feral da Nhecolândia, Mato Grosso do Sul, Brasil. Utilização da técnica de imuno-histoquímica para a detecção do agente. *Cienc. Rural*, v.34, n.1, p.165-169, 2004.

GIRIO, T.M.S.; MAGAJEVSKI, F.S.; GIRIO, R.J.S.; MIASHYRO, S.; RODRIGUES, L.H.; SCARCELLI, E.P.; TOMA, S.B. Uso de estreptomicina na eliminação da leptospirose em touros (*Bos taurus indicus*) naturalmente infectados pelo sorovar Hardjo. *Arq. Inst. Biol.*, v.72, n.2, p.161-170, 2005.

GRAVEKAMP, C.; KORVER, H.; MONTGOMERY, J.; EVERARD, C.O.; CARRINGTON, D.; ELLIS, W.A.; TERPSTRA, W.J. Leptospire isolated from toads and frogs in on the Island of Barbados. *Zentralbl. Bakteriol.*, v.275, n.3, p.403-411, 1991.

GROOMS, D.L.; BOLIN, C.A. Diagnosis of fetal loss caused by bovine viral diarrhoea virus and *Leptospira* spp.. *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.*, v.21, n.2, p.463-472, 2005.

HAAKE, D.A.; MATSUNAGA, J. *Leptospira*: a spirochaete with a hybrid outer membrane. *Mol. Microbiol.*, v.77, n.4, p.805-814, 2010.

HARKIN, K.R.; ROSHTO, Y.M.; SULLIVAN, J.T.; PURVIS, T.J.; CHEENGAPPA, M.A. Comparison of polymerase chain reaction assay, bacteriologic culture, and serologic testing in assessment of prevalence of urinary shedding of leptospires in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.222, n.9, p.1230-1233, 2003.

HARRISON, N.A.; FITZGERALD, W.R. Leptospirosis – can it be a sexually transmitted disease ? *Postgrad. Med. J.*, v.64, p.163-164, 1988.

HATHAWAY, S.C.; LITTLE, T.W.A.; STEVENS, A.E. Serological survey of leptospiral antibodies in sheep from England and Wales. *Vet. Rec.*, v.110, n.5, p.99-101, 1982.

HEALTH, C.W.J.; ALEXANDER, A.D.; GALTON, M.M. Leptospirosis in the United States: analysis of 483 cases in man. *N. Engl. J. Med.*, v.273, p.857-864, 915-922, 1965.

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

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, P.; DÍAZ, C.A.; DALMAU, E.A.; QUINTERO, G.M. A comparison between polymerase chain reaction and traditional techniques for the diagnosis of leptospirosis in bovines. *J. Microbiol. Methods.*, v.84, p.1-7, 2011.

HERRMANN, G.P.; LAGE, A.P.; MOREIRA, E.C.; HADDAD, J.P.A.; RESENDE, J.R.; RODRIGUES, R.O.; LEITE, R.C. Soroprevalência de aglutininas anti-*Leptospira* spp. em ovinos nas Mesorregiões Sudeste e Sudoeste do Estado Rio Grande do Sul, Brasil. *Cienc. Rural*, v.34, n.2, p.443-448, 2004.

HODGIN, E.C.; MILLER, D.A.; LOZANO, F. *Leptospira* abortion in horses. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.1, p.283-287, 1989.

HUNTER, P.; VAN DER VYVER, F.H.; SELMER-OLSEN, A.; HENTON, M.M.; HERR, S.; DE LANGE, J.F. Leptospirosis as cause of "white spots" kidneys in South African pig abattoirs. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, v.54, p.59-62, 1987.

IDO, Y.; HOKI, R.; ITO, H.; WANI, H. The rat as a carrier of *Spirochaeta icterohamorrhagiae*, the causative agent of Weil's disease (spirochaetosis, icterohamorrhagica). *J. Exp. Med.*, v.26. p.431-353, 1917.

KALTENBOEJ, B.; WANG, C. Advances in real-time PCR: application to clinical laboratory diagnostics. *Adv. Clin. Chem.*, v.40, p.219-259, 2005.

KIM, N.; KIM, J.J.; CHOE, Y.H.; KIM, H.S.; KIM, J.I.; CHUNG, I.S.; Diagnosis and treatment guidelines for *Helicobacter pylori* infection in Korea. *Korean J. Gastroenterol.*, v.54, n.5, p.269-278, 2009.

LANGONI, H.; DA SILVA, A.V.; PEZERICO, S.B.; DE LIMA, V.Y. Anti-leptospire agglutinins in equine sera, from São Paulo, Goiás, and Mato Grosso do Sul, Brazil, 1996-2001. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, v.10, n.3, p.207-218, 2004.

LANGONI, H.; MARINHO, M.; BALDINI, S.; DA SILVA, A.V.; CABRAL, K.G.; DA SILVA, E.D. Pesquisa de aglutininas antileptospíricas em soros de ovinos no Estado de São Paulo, Brasil, utilizando-se as provas de macroaglutinação em placa e soroaglutinação microscópica. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v.17, n.2, p.264-268, 1995.

LANGONI, H.; SOUZA, L.C.; SILVA, A.V.; LUVIZOTTO, M.C.R.; PAES, A.C.; LUCHEIS, S.B. Incidence of leptospiral abortion in Brazilian dairy cattle. *Prev. Vet. Med.*, v.40, p.271-275, 1999.

LAU, C.; SMYTHE, L.; WEINSTEIN, P. Leptospirosis: an emerging disease in travelers. *Travel. Med. Infect. Dis.*, v.8, n.1, p.33-39, 2010.

LEES, V.W.; GALE, S.P.; Titers to *Leptospira* species in horses in Alberta. *Can. Vet. J.*, v.35, n.10, p.636-640, 1994.

LÉON, A.; PRONOST, S.; TAPPREST, J.; FOUCHER, N.; BLANCHARD, B.; ANDRÉ-FONTAINE, G.; LAUGIER, C.; FORTIER, G.; LECLERCQ, R. Identification of pathogenic *Leptospira* strains in tissues of a premature foal by use of polymerase chain reaction analysis. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.18, p.218-221, 2006.

LEON-VIZCAINO, L.; MENDOZA, M.H.; GARRIDO, F. Incidence of abortions caused by leptospirosis in sheep and goats in Spain. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, v.10, n.2, p.149-153, 1987.

LEVETT, P.N. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.14, n.2, p.296-326, 2001.

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. *J. Med. Microbiol.*, v.54, p.45-49, 2005.

LILENBAUM, W.; VARGES, R.; BRANDÃO, F.Z.; CORTEZ, A.; SOUZA, S.O.; BRANDÃO, P.E.; RICHTZENHAIN, L.J.; VASCONCELLOS, S.A. Detection of *Leptospira* spp. in semen and vaginal fluids of goats and sheep by polymerase chain reaction. *Theriogenol.*, v.69, p.837-842, 2008.

LILENBAUM, W.; VARGES, R.; RISTOW, P.; CORTEZ, A.; SOUZA, S.O.; RICHTZENHAIN, L.J.; VASCONCELLOS, S.A. Identification of *Leptospira* spp. carriers among seroreactive goats and sheep by polymerase chain reaction. *Res. Vet. Sci.*, v.87, p.16-19, 2009.

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 and urine of bulls serologically reactive to *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. *Braz. J. Microbiol.*, v.36, p.43-47, 2005.

MARINHO, M. Leptospirose: fatores epidemiológicos, fisiopatológicos e imunopatogênicos. *Veterinária e Zootecnia*, v.15, n.3, p.428-434, 2008.

MARINHO, M.; LANGONI, H.; OLIVEIRA, S.L.; CARREIRA, R.; PERRI, S.H.V.; LUVIZOTO, M.C. Resposta humoral, recuperação bacteriana e lesões histológicas em camundongos geneticamente selecionados para bons e maus

produtores de anticorpos e balb/c, frente à infecção por *Leptospira interrogans* sorovar icterohaemorrhagiae. *Pesq. Vet. Bras.*, v.23, n.1, p.5-12, 2003.

MARINHO, M.; SILVA, C.; LIMA, V.M.F.; PEIRÍ, J.R.; PERRI, S.H.V. Cytokine and antibody production during murine leptospirosis. *J. Ven. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, v.12, n.4, p.595-603, 2006.

MARTIN, L.; PETTIT, A. Sero-diagnostic de la spirochaetose icterohaemorrhagique. *Bull. Mem. Soc. Med. Hop.*, v.42, p.672-675, 1918.

MARTINS, G.; PENNA, B.; HAMOND, C.; LEITE, R.C.; SILVA, A.; FERREIRA, A.; BRANDÃO, F.; OLIVEIRA, F.; LILENBAUM, W. Leptospirosis as the most frequent infectious disease impairing productivity in small ruminants in Rio de Janeiro, Brazil. *Trop. Anim. Health Prod.*, Epub ahead of print, 2011.

MARTINS, G.; PENNA, B.; LILENBAUM, W. Maintenance of *Leptospira* infection in cattle under tropical conditions. *Vet. Rec.*, v.167, p.629-630, 2010.

MAYER-SCHOOL, A.; DRAEGER, A.; LUGE, E.; ULRICH, R.; NÖCKLER, K. Comparison of two PCR systems for the rapid detection of *Leptospira* spp. from kidney tissue. *Curr. Microbiol.*, v.62, p.1104-1106, 2011.

MELO, L.S.S.; CASTRO, M.B.; LEITE, R.C.; MOREIRA, E.C.; MELO, C.B. Principais aspectos da infecção por *Leptospira* sp. em ovinos. *Cienc. Rural*, v.40, n.5, p.1235-1241, 2010.

MERIEN, F.; AMOURIAUX, P.; PEROLAT, P.; BARANTON, G.; SAINT GIRONS, I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.*, v.30, p.2219-2224, 1992.

MERIEN, F.; BARANTON, G.; PEROLAT, P. Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. *J. Infect. Dis.*, v.172, p.281-285, 1995.

MERIEN, F.; PEROLAT, P.; MANCIEL, E.; PERSAN, D.; BARANTON, G. Detection of *Leptospira* DNA by polymerase chain reaction in aqueous humor from a patient with unilateral uveitis. *J. Infect. Dis.*, v.168, p.1335-1336, 1993.

MERIEN, F.; PORTNOI, D.; BOURHY, P.; CHARAVAY, F.; BERLIOZ-ARTHAUD, A.; BARANTON, G. A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. *FEMS Microbiol. Lett*, v.249, n.1, p.139-147, 2005.

MINETTE, H.P. Leptospirosis in poikilothermic vertebrates. A review. *Int. J. Zoonoses*, v.10, n.2, p.111-121, 1983.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Manual de controle de roedores*. Brasília, 2002. 131p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Manual de Leptospirose*. Brasília, 1995. 98p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Leptospirose: Diagnóstico e Manejo Clínico*. Brasília, 2009. 21p.

MOTIE, A.; MYERS, D.M. Leptospirosis in sheep and goats in Guyana. *Trop. Anim. Health Prod.*, v.118, p.113-114, 1986.

ODONTSETSEG, N.; BOLDBAATAR, D.; MWEENE, A.S., KIDA, H. Serological prevalence of *Leptospira interrogans* serovar Bratislava in horses in Mongolia. *Vet. Rec.*, v.157, n.17, p.518-519, 2005.

OLIVEIRA, A.A.; MOTA, R.A.; PEREIRA, G.C.; LANGONI, H.; SOUZA, M.I.; NAVEGANTES, W.A.; SÁ, M.E.. Seroprevalence of bovine leptospirosis in Garanhuns Municipal District, Pernambuco State, Brazil. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, v.68, n.4, p.275-279, 2001.

OOTEMAN, M.C.; VAGO, A.R.; KOURY, M.C. Evaluation of MAT, IgM ELISA and PCR methods for the diagnosis of human leptospirosis. *J. Microbiol. Methods*, v.65, n.2, p.247-257, 2006.

ORTEGA-PACHECO, A.; COLIN-FLORES, R.F.; GUTIÉRREZ-BLANCO, E.; JIMÉNEZ-COELLO, M. Frequency and type of renal lesions in dogs naturally infected with *Leptospira* species. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.1149, p.270-274, 2008.

PINNA, A.E.; MARTINS, G.; HAMOND, C.; LILENBAUM, W.; MEDEIROS, M.A. Molecular diagnosis of leptospirosis in horses is becoming increasingly important. *Vet. Microbiol.*, v.153, p.413, 2011.

POONACHA, K.B.; DONAHUE, J.M.; GILES, R.C.; HONG, C.B.; PETRITES-MURPHY, M.B.; SMITH, B.J.; SWERCZEK, T.W.; TRAMONTIN, R.R.; TUTTLE, P.A. Leptospirosis in equine fetuses, stillborn foals, and placentas. *Vet. Pathol.*, v.30, p.362-369, 1993.

PROPHET, E.B.; MILLIS, B.; ARRINGTON, J.B.; SOBIN, L.H. *Laboratory methods in histotechnology*. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1992. p.214-15.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. Espiroquetas. In: _____. *Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas*. São Paulo: Artmed, 2005. chap.31, p.179-188.

RAHELINIRINA, S.; LÉON, A.; HARSTSKEERL, R.A.; SERTOUR, N.; AHMED, A.; RAHARIMANANA, C.; FERQUEL, E.; GARNIER, M.; CHARTIER, L.; DUPLANTIER, J.; RAHALISON, L.; CORNET, M. First isolation and direct evidence for the existence of large small-mammal reservoir of *Leptospira* sp. in Madagascar. *PLoS One*, v.5, n.11, p.e14111, 2010.

RADL, C.; MÜLLER, M.; REVILLA-FERNANDEZ, S.; KARNER-ZUSER, S.; DE MARTIN, A.; SCHAUER, U.; KARNER, F.; STANEK, G.; BALCKE, P.; HALLAS, A.; FRANK, H.; FÜRNSCHLIEF, A.; ERHART, F.; ALLERBERGER, F. Outbreak of leptospirosis among triathlon participants in Langau, Austria, 2010. *Wien. Klin. Wochenschr.*, v.24, *In press*, 2011

RIS, D.R. Limitations of the use of 5-fluoruracil as a selective agent for the isolation of leptospires. *Appl. Microbiol.*, v.27, n.1, p.270-271, 1974.

ROACH, J.M.; VAN VUUREN, M.; PICARD, J.A. A serological survey of antibodies to *Leptospira* species in dogs in South Africa. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, v.81, n.3, p.156-9, 2010.

ROCHA, T.; ELLIS, W.A.; MONTGOMERY, J.; GILMORE, C.; REGALLA, J.; BREM, S. Microbiological and serological study of leptospirosis in horses at slaughter: first isolations. *Res. Vet. Sci.*, v.76, n.3, p.199-202, 2004.

ROJAS, P.; MONAHAN, A.M.; SCHULLER, S.; MILLER, I.S.; MARKEY, B.K.; NALLY, J.E. Detection and quantification of leptospires in urine of dogs: a maintenance host for the zoonotic disease leptospirosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, v.29, n.10, p.1305-1309, 2010.

SANTA ROSA, C.A.; PESTANA DE CASTRO, A.F. Presença de aglutininas antileptospiras em soros de ovinos e caprinos no Estado de São Paulo. *Arq. Inst. Biol.*, v.30, p.93-98, 1963.

SCANZIANI, E.; CRIPPA, L.; GIUSTI, A.M.; LUINI, M.; PACCIARINI, M.L.; TAGLIABUE, S.; CAVALLETTI, E. *Leptospira interrogans* serovar *sejroe* infection in a group of laboratory dogs. *Lab. Anim.*, v.29, n.3, p.300-306, 1995.

SEBASTIAN, M.; GILES, R.; ROBERTS, J.; POONACHA, K.; HARRISON, L.; DONAHUE, J.; BENIRSCHKE, K. Funisitis associated with leptospiral abortion in an equine placenta. *Vet. Pathol.*, v.42, p.659-662, 2005.

SEGURA, E.R.; GANOZA, C.A.; CAMPOS, K.; RICARDI, J.N.; TORRES, S.; SILVA, H.; CÉSPEDES, M.J.; MATTHIAS, M.A.; SWANCUTT, M.A.; LIÑÁN, R.L.; GOTUZZO, E.; GUERRA, H.; GILMAN, R.H.; VINETZ, J.M. Clinical spectrum of pulmonary involvement in leptospirosis in a region of endemicity, with quantification of leptospiral burden. *Clin. Infect. Dis.*, v.40, n.3, p.342-351, 2005.

SEIXAS, L.S.; MELO, C.B.; LEITE, R.C.; MOREIRA, E.C.; MCMANUS, C.M.; CASTRO, M.B. Anti-*Leptospira* sp. agglutinins in ewes in the Federal District, Brazil. *Trop. Anim. Health Prod.*, v.43, p.9-11, 2011.

SEJVAR, J.; BANCROFT, E.; WINTHROP, K.; BETTINGER, J.; BAJANI, M.; BRAGG, S.; SHUTT, K.; KAISER, R.; MARANO, N.; POPOVIC, T.; TAPPERO, J.; ASHFORD, D.; MASCOLA, L.; VUGIA, D.; PERKINS, B.; ROSENSTEIN, N.; ECO-CHALLENGE INVESTIGAION TEAM. Leptospirosis in "Eco-Challenge"

athletes, Malaysian Borneo, 2000. *Emerg. Infect. Dis.*, v.9, n.6, p.702-707, 2000.

SHIMABUKURO, F.H.; DOMINGUES, P.F.; LANGONI, H.; SILVA, A.V.; PLOMBON, J.; PADOVANI, C.R. Pesquisa de suínos portadores renais de leptospirosas pelo isolamento microbiano e reação em cadeia pela polimerase em amostras de rins de animais sorologicamente positivos e negativos para leptospirose. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.40, n.4, p.243-253, 2003.

SILVA, E.F.; BROD, C.S.; CERQUEIRA, G.M.; BOURSCHEIDT, D.; SEYFFERT, N.; QUEIROZ, A.; SANTOS, C.S.; KO, A.I.; DELLAGOSTIN, O.A. Isolation of *Leptospira noguchii* from sheep. *Vet. Microbiol.*, v.121, p.144-149, 2007.

SLAMTI, L.; PEDRO, M.A.; GUICHET, E.; PICARDEAU, M. Deciphering morphological determinants of the helix-shaped *Leptospira*. *J. Bacteriol.*, v.193, n.22, p.6266-6275, 2011.

SOTO, F.R.M.; VASCONCELLOS, S.A.; PINHEIRO, S.R.; BERNARSI, F.; CAMARGO, S.R. Leptospirose suína. *Cienc. Rural*, v.74, n.4, p.379-395, 2007.

STODDARD, R.A.; GEE, J.E.; WILKINS, P.P.; MCCAUSTLAND, K.; HOFFMASTER, A.R. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the Lip32 gene. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v.64, n.3, p.247-255, 2009.

SUEPAUL, S.M.; CARRINGTON, C.V.; CAMPBELL, M.; BORDE, G.; ADESIYUN, A.A. Seroepidemiology of leptospirosis in livestock in Trinidad. *Trop. Anim. Health Prod.*, v.43, p.367-375, 2011.

SULZER, C.R.; JONES, W.L. *Leptospirosis: methods in laboratory diagnosis*. Atlanta: Department of Health, Education and Welfare, 1978.

THAIPADUNPANIT, J.; CHIERAKUL, W.; WUTHIEKANUM, V.; LIMMATHUROTSAKUL, D.; AMORNCHAI, P.; BOONSLIP, S.; SMYTHE, L.D.; LIMPAIBOON, R.; HOFFMASTER, A.R.; DAY, N.P.J.; PEACOCK, S.J. Diagnostic accuracy of real-time PCR assays targeting 16S rRNA and *lip32*

genes for human leptospirosis in Thailand: a case-control study. *PLoS One*, v.6, n.1, p.e16236, 2011.

TRUCCOLO, J.; CHARAVAY, F.; MERIEN, F.; PEROLAT, P. Quantitative PCR assay to evaluate ampicillin, ofloxacin, and doxycycline for treatment of experimental leptospirosis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.46, n.3, p.848-853, 2002.

VAN EYES, G.J.J.M.; GRAVEKAMP, C.; GERRITSEN, M.J.; QUINT, W.; CORNELISSEN, M.T.E.; TER SCHEGGET, J.; TERPSTRA, W.J. Detection of leptospires in urine by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, v.27, n.10, p.2258-2262, 1989.

VERMUNT, J.J.; WEST, D.M.; COOKE, M.M.; ALLEY, M.R.; COLLINS-EMERSON, J. Observations of three outbreaks of *Leptospira interrogans* serovar *Pomona* infection in lambs. *N. Z. Vet. J.*, v.42, n.4, p.133-136, 1994.

VIJAYACHARI, P.; SUGUNAN, A.P.; SHRIRAM, A.N. Leptospirosis: an emerging global public health problem. *J. Biosci.*, v.33, n.4, p.557-569, 2008.

WADA, S.; YOSHINARI, M.; KATAYAMA, Y.; ANZAI, T.; WADA, R. Nonulcerative keratouveitis as a manifestation of Leptospiral infection in a horse. *Vet. Ophthalmol.*, v.6, n.3, p.191-195, 2003.

WAGENAAR, J.; ZUERNER, R.L.; ALT, D.; BOLIN, C.A. Comparison of polymerase chain reaction assays with bacteriologic culture, immunofluorescence, and nucleic acid hybridization for detection of *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo in urine of cattle. *Am. J. Vet. Res.*, v.61, n.3, p.316-320, 2000.

WEIL, A. Ueber eine eigentümliche, mit Milztumor, Icterus und Nephritis einhergehende akute Infektionskrankheit. *Dtsche. Arch. Klin. Med.*, v.39, p.209-232, 1886.

WILLIAMS, D.M.; SMITH, B.J.; DONAHUE, J.M.; POONACHA, K.B. Serological and microbiological findings on 3 farms with equine leptospiral abortions. *Equine Vet. J.*, v.26, n.2, p.105-108, 1994.

WOODWARD, M.J. *Leptospira*. In: SUSSMAN, M. *Molecular Medical Microbiology*. London: Harcourt-International Academic Press, 2001, p.2137-2159.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control*. Malta, 2003. 110p.

WUTHIEKANUN, V.; CHIERAKUL, W.; LIMMATHUROTSAKUL, D.; SMYTHE, L.D.; SYMONDS, M.L.; DOHNT, M.F.; SLACK, A.T.; LIMPAIBOON, R.; SUPUTTAMONGKOL, T.; WHITE, N.J.; DAY, N.P.J.; PEACOCK, S.J. Optimization of culture of *Leptospira* from humans with leptospirosis. *J. Clin. Microbiol.*, v.45, n.4, p.1363-1365, 2007.

ZAMORA, J.; RIEDEMANN, S.; TADICH, N. A serological survey of leptospirosis in sheep in Chile. *Rev. Latinoam. Microbiol.*, v.42, n.1, p.73-76, 1999.

Artigo científico

O artigo científico esta de acordo com as normas da revista “Veterinary Microbiology”

Comparison of conventional PCR, quantitative PCR, bacteriological culture and the Warthin Starry technique to detect *Leptospira* spp. in kidney and liver samples from naturally infected sheep from Brazil

Felipe Fornazari^a, Rodrigo Costa da Silva^a, Virginia Bodelão Richini-Pereira^a, Hugo Enrique Orsini Beserra^b, Maria Cecília Rui Luvizotto^b, Helio Langoni^{a*}

^a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP Univ Estadual Paulista, Campus Botucatu, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Núcleo de Pesquisas em Zoonoses (NUPEZO). Rubião Jr. District, Botucatu, SP, Brazil. CEP: 18618-970

^b Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, UNESP Univ Estadual Paulista, Campus Araçatuba, Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal. Clóvis Pestana Street, 793, Araçatuba, SP, Brazil. CEP: 16050-680

Abstract

Leptospirosis is an infectious disease of worldwide importance. The development of diagnostic techniques allows sick animals to be identified, reservoirs to be eliminated and the disease prevented and controlled. The present study aimed to compare different techniques for diagnosing leptospirosis in sheep. Samples of kidney, liver and blood were collected from 465 animals that originated from a slaughterhouse. The sera were submitted to the Microscopic Agglutination Test (MAT), and kidney and liver samples of seropositive animals were analyzed using four techniques: bacteriological culture, the

26 Warthin Starry (WS) technique, conventional PCR (cPCR), and quantitative PCR
27 (qPCR). With the MAT, 21 animals were positive (4.5%) to serovars Hardjo (n=12),
28 Hebdomadis (n=5), Sentot (n=2), Wolfii (n=1) and Shermani (n=1). Titers were 100
29 (n=10), 200 (n=2), 400 (n=6) and 1600 (n=3). No animal was positive by
30 bacteriological culture; four animals were positive by the WS technique in kidney
31 samples; six animals were positive by cPCR in kidney samples; and 11 animals were
32 positive by qPCR, eight of which in kidney samples and three in liver. The bacterial
33 quantification revealed a median of 4.3 bacteria/ μ L in liver samples and 36.6
34 bacteria/ μ L in kidney samples. qPCR presented the highest sensitivity among the
35 techniques, followed by cPCR, the WS technique and bacteriological culture. These
36 results indicate that sheep can carry leptospires of the Sejroe serogroup, and
37 demonstrate the efficiency of quantitative PCR to detect *Leptospira* spp. in tissue
38 samples.

39 Key-words: leptospirosis, diagnosis, PCR, sheep, public health.

40

41 1. Introduction

42 Leptospirosis is a zoonotic disease, distributed worldwide, caused by bacteria of
43 *Leptospira* spp. genus. Several species, grouped in more than 250 serovars, are
44 responsible for infection in animals and men (Levett, 2001). The disease and
45 distribution of the bacteria are usually associated with high levels of humidity and
46 temperature, which contribute to its survival in the environment. Inadequate sanitary
47 conditions also contribute to the occurrence of the disease, favoring rodent
48 establishment and water accumulation. Thus, developing countries, including Brazil,
49 are responsible for a great number of cases of leptospirosis. The infection occurs
50 through direct contact with urine or tissue from an infected animal, or through contact

51 with water or soil previously contaminated by urine (Adler and Moctezuma, 2010). In
52 animals and humans leptospirosis is usually asymptomatic, but in some cases can
53 develop severe clinical features. The symptoms are associated mainly with pulmonary,
54 hepatic and renal lesions (Faine et al., 1999).

55 Leptospirosis is of great importance in domestic animals. Once infected, they can
56 eliminate the leptospires in the environment, thus acting as a source of infection and
57 offering a risk to public health. Leptospirosis can also be an important cause of the
58 decrease in animal production. Infected animals are prone to abortions, weak newborns,
59 mastitis, and a decrease in their growth rate. Besides, these problems have a direct
60 impact on the economy (Langoni et al., 1999; Adler and Moctezuma, 2010).

61 Diagnostic tests represent an important tool that contributes to prevention of
62 leptospirosis (Faine et al., 1999). A specific, sensitive and rapid diagnostic test available
63 on a large scale is essential for controlling diseases of an infectious nature. In the
64 diagnostic routine of leptospirosis the microscopic agglutination test (MAT) is
65 considered the reference test (Who, 2003). High titers or paired samples showing titer
66 increasing indicates recent infection. But MAT has some disadvantages, such as: in the
67 acute phase it can present negative results; the analysis of paired samples compromises
68 a rapid diagnosis; the interpretation is subjective; the lack of a precise cut-off value; and
69 it is necessary to maintain and replicate several living leptospira serovars (Cumberland
70 et al., 1999; Grooms and Bolin, 2005; Merien et al., 2005; Hernández-Rodríguez et al.,
71 2011). For a more reliable diagnosis the presence of *Leptospira* spp. has to be
72 confirmed by direct techniques. Over the last few years molecular tests have
73 demonstrated many advantages over traditional leptospirosis diagnosis techniques
74 (Levett, 2001).

Due to the importance of sheep the trade in Brazil and the lack of studies involving leptospirosis diagnosis in this species, the present study aimed to compare the conventional PCR, the quantitative PCR, the Warthin Starry technique and the bacteriological culture to detect *Leptospira* spp. in kidney and liver samples of seropositive naturally infected sheep from Brazil.

2. Material and Methods

2.1. Animals

Epi Info 3.5.1 software (CDC, 2008) was used to determine the minimum number of samples (n), adopting 18.68% as expected prevalence (Da Silva et al., 2012), a significance level (α) of 5.0 %, a confidence level of 95%, and an error limit of 4%, resulting in a sample number (n) of 365 animals, which was adjusted to 465 animals. This number was determined considering a Brazilian population of 253 500 sheep slaughtered in 2008, and of 8 300 in São Paulo State (3.27%) (Brasil, 2009).

The samples were collected in a slaughterhouse located in São Manuel (22°43'S 48°34'W), São Paulo State, Brazil, between November 2009 and October 2010. Animals were randomly selected, included males and females and most of them were adult crossbreed individuals. Although no detailed health assessment could be obtained from the animals before sampling, none of them showed any signs of disease, and appeared clinically healthy at the moment of slaughter. Sheep came from properties located in the States of São Paulo (73.1%), Rio Grande do Sul (11.6%), Mato Grosso (6.4%) and Goiás (6.4%). Because this study focused on comparing diagnostic techniques, it was not intended to use a representative number of animals from each region, or from several regions in the country. More details about the animal's origin could not be obtained. Blood, kidney and liver from 465 sheep were collected during

100 abattoir procedures, stored in plastic bags, and transported in a thermal box to the
101 Zoonosis Research Nucleus (NUPEZO), São Paulo State University, São Paulo State,
102 Brazil. The blood samples were centrifuged (3000 rpm for 10 min) and the sera assayed
103 by serologic trial immediately after arrival in the laboratory. Only tissue samples from
104 seropositive animals were submitted to other diagnostic tests. Additionally, 15
105 seronegative animals, chosen randomly, were also used as negative controls and tested
106 using the same techniques.

107

108 2.2. Serology

109 The sera were tested for *Leptospira* spp. antibodies by the microscopic
110 agglutination test (MAT), using a battery of 25 serovars, and 4 variants of the serovar
111 Hardjo, maintained and replicated weekly in Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris
112 (EMJH) media (Difco Laboratories[®], USA) at 28°C, as follow: Australis, Bratislava,
113 Autumnalis, Butembo, Castellonis, Bataviae, Canicola, Whitcombi, Cynopteri,
114 Djasiman, Sentot, Gryppotyphosa, Hebdomadis, Copenhageni, Icterohaemorrhagiae,
115 Javanica, Panama, Pomona, Pyrogenes, Hardjo Prajitno, Hardjo Miniswajezak, Hardjo
116 C.T.G., Hardjo Bovis, Wolffii, Shermani, Tarassovi, Andamana and Patoc. Sera were
117 diluted in phosphate buffered saline (PBS) water (pH 7.6) at 10⁻² dilution, mixed
118 individually with each serovar suspension in the proportion 1:1, and incubated at 28°C
119 for 1 hour. Pure PBS (pH 7.6) solution was used as negative control. The analysis was
120 performed in dark field microscopy (Carl Zeiss[®], Germany) with magnification of
121 100X. Samples were considered positive when 50% or more leptospire were
122 agglutinated at 10⁻² dilution, considering a cut-off titer of 100. The reactive serovar was
123 considered the one that presented the highest titer. The variants of serovar Hardjo were
124 not considered as independent serovars, and samples giving a positive reaction to one or

125 more of them were considered as reacted to serovar Hardjo. Positive samples were
126 further diluted in the proportions 1:200, 1:400, 1:800 and 1:1600, and tested only to the
127 reacted serovar to determine their titer.

128

129 2.3. Bacteriological culture

130 Bacteriological culture was performed immediately after the serological analysis.
131 Fragments of kidney and liver from seropositive animals were placed in a lamina flow
132 chamber (VLFS-18, Veco[®], USA), and their surface sterilized with iodine-alcohol
133 (70%) and ultra-violet light for 20 minutes. Pieces of approximately 1 g were collected
134 from the interior of each fragment using sterile scissors, individually macerated with a
135 mortar and pestle, and added to 4 mL of a sterile solution containing water (500 mL),
136 neomycin (12.5 mg, Vansil[®], Brazil) and nitrofurazone (12.5 mg, Rioquímica[®], Brazil).
137 Four dilutions of this mixture were prepared (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} and 10^{-3}) using sterile PBS
138 (pH 7.6) solution. A fraction of 10^0 dilution was stored at -80°C in sterile DNase and
139 RNase free microtubes (Axygen[®], USA), to be further submitted to conventional and
140 quantitative Polymerase Chain Reaction. A portion (0.5 mL) of each dilution of the
141 tissue was individually cultured in sterile glass tubes containing 4.5 mL of Fletcher's
142 semisolid medium (DIFCO Laboratories[®], USA), pH 7.6, without antibiotics, enriched
143 with rabbit sera (10%). Subsequently the tubes were incubated at 28°C, for 60 days. The
144 leptospires were visualized in dark field microscopy (Carl Zeiss[®], Germany) with
145 magnification of 400X.

146

147 2.4. Warthin Starry technique

148 For the Warthin Starry (WS) technique, fragments of liver and kidney were
149 collected immediately after the serology results, fixed in buffered formaldehyde (10%)

150 for 48 hours, washed in running water for one hour, and stored in ethylic alcohol (70%)
151 until the histological analysis. Samples were transported to the Department of Clinic,
152 Surgery and Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine, Araçatuba campus,
153 São Paulo State, Brazil. Kidney and liver samples were dehydrated, diaphonized,
154 immersed in paraffin, and cut in an automatic microtome (Leica®, Germany) at a
155 thickness of 4 µm, according to standard protocols for histological analysis. The
156 sections were de-parafinized, rehydrated, and immersed in silver solution (1%) at 43°C
157 for 30 minutes. Stain revelation was carried out in hydroquinone solution for 4 minutes.
158 The lamina was then washed in distilled water, dehydrated, diaphonized and mounted in
159 synthetic resin (Permunt™) and a coverslip. The analysis was carried out in an optical
160 microscope (Carl Zeiss®, Germany) with magnification of 1000X.

161

162 2.5. DNA Extraction

163 A fraction of the mixture used for culture (dilution 10^0) and previously stored at -
164 80°C was submitted to conventional PCR (cPCR) and to quantitative PCR (qPCR).
165 Genomic DNA was extracted using a commercially available DNA extraction kit,
166 Illustra Tissue & Cells genomic Prep Mini Spin® kit (GE Healthcare, USA), in
167 accordance with the manufacturer's instructions, and evaluated in a NanoVue®
168 spectrophotometer (GE Healthcare, USA). The positive control consisted of a
169 *Leptospira interrogans* serovar Hardjo strain, kept in EMJH media, previously
170 centrifuged (3000 rpm for 10 min) and resuspended twice in sterile PBS (pH 7.6)
171 solution. Milli-Q water was used as negative control.

172

173

174

175 2.6. Conventional PCR (cPCR)

176 DNA amplification was performed in sterile DNase and RNase free microtubes
 177 (1.5 mL) (AXYGEN[®], USA), using genus specific primers described by Merien et al.
 178 (1992), corresponding to nucleotides 38 to 57 (LEP-1, 5'-
 179 GGCGGCGCGTCTTAAACATG-3') and 348 to 369 (LEP-2, 5'-
 180 TTCCCCCATTGAGCAAGATT-3') of the primary structure of 16 S rRNA gene
 181 (GenBank accession n. X17547.1) from *Leptospira interrogans* serovar Canicola, which
 182 results in a product of 331 base pairs (bp). Each tube (0.2 mL) received 2.5 µL of PCR
 183 buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0), 0.75 µL of MgCl₂ (1.5 mM), 0.5 µL of
 184 *Taq platinum* polymerase (5U/µL) (Invitrogen[®], USA), 0.5 µL dNTP solution (200µM)
 185 (Invitrogen[®], USA), 0,5 µL of each oligonucleotide (10 pmol) (IDT), 17.5 µL of ultra-
 186 pure water (Gibco[®], USA) and 2 µL of DNA obtained from the extraction step. Positive
 187 and negative controls were the same ones used for DNA extraction. Amplification was
 188 performed in Mastercycler ep Gradient (Eppendorf[®], USA) thermo-cycler, with a cycle
 189 of initial denaturation at 94°C for 3 minutes, followed by 30 cycles at 94°C for one
 190 minute, annealing at 63°C for 1.5 minutes, and extension at 72°C for two minutes.

191 Aliquots of 10 µL of each amplified product were added to 2 µL of BlueJuice
 192 (Invitrogen[®], USA). After homogenization, this solution was submitted to horizontal
 193 electrophoresis in agarose gel (2.0%) stained with ethidium bromide (10 mg/mL, Gibco[®],
 194 USA) in a TBE buffered solution 1x (0.09 M Tris-HCl, 0.09 M of boric acid, 2mM
 195 EDTA, pH 8.3), for 60 minutes at 90V (Electrophoresis Power Supply Model EPS 301,
 196 GE Healthcare[®], USA). The bands were visualized under ultraviolet light (296 nm), and
 197 registered using the GelDoc-IT[™] (Imaging System) system (UVP, USA) and Vision
 198 Works[®] LS software (UVP, USA).

199

200 2.7. Quantitative PCR (qPCR)

201 The quantitative PCR (qPCR) was performed using the SYBR® Green system, by
202 means of StepOne™ Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems®, USA)
203 equipment, and the same primers described for cPCR. The standard curve was
204 developed using the positive control described for DNA extraction, in decreasing
205 concentrations in the proportion of 5, beginning from an initial concentration of 40 000
206 bacteria/μL (bact/μL), previously calculated in dark field microscopy.

207 The final volume of the assay was 25 μL, consisting of 12.5 μL of Power
208 SYBR®Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA), 1 μL of each primer (5
209 μM), 2 μL of DNA and 8.5 μL of sterile Milli-Q water. The following conditions were
210 used: 95°C for 10 minutes, 40 cycles at 95°C for 15 seconds, 60°C for one minute and a
211 step for the dissociation curve at 95°C for 15 seconds, 60°C for one minute and 95°C for
212 15 seconds. The fluorescence signs were obtained along the extension steps of the
213 amplification cycles. All samples were processed in duplicates. The DNA load present
214 in the samples was expressed in relation to the standard curve, which was added to each
215 assay, and the values analyzed by the equipment software.

216

217 2.8. Statistical analysis

218 The association between the results of the MAT, cPCR, qPCR, bacteriological
219 culture and WS technique were verified by the McNemar test. All statistical analyses of
220 the results were calculated considering MAT and qPCR separately as the gold standard
221 test, using the worksheet described by Mackinnon (2000). These tests were chosen as
222 gold standard because MAT is considered the reference technique for leptospirosis
223 diagnosis (Who, 2003), and because qPCR has previously proved to be highly sensitive
224 to detect *Leptospira* spp. (Ahmed et al., 2009). The correlations between the antibody

titers obtained by MAT, regardless of the prevalent serovar, specific for the most frequent serovars, and specific for the most prevalent Hardjo variants, as well as the DNA concentration, were analyzed using the Spearman correlation test (r). The remaining statistical analysis was performed using the Epi Info 3.5.1 and BioEstat 5.0 software, considering $\alpha = 5\%$.

230

231 3. Results

232 In the MAT 21 animals were positive (4.5%; IC 95% 3.0-6.8%) to serovars
233 Hardjo (n=12), Hebdomadis (n=5), Sentot (n=2), Wolfii (n=1) and Shermani (n=1). The
234 titers were 100 (n=10), 200 (n=2), 400 (n=6) and 1600 (n=3). Of the 11 animals with
235 titers higher than 100, 10 were reagent to serovar Hardjo and one to serovar
236 Hebdomadis, indicating that high titers were more associated with serogroup Sejroe
237 (serovar Hardjo) than the others (Table 1).

238 All the animals were negative to bacteriological culture, for both kidney and liver
239 samples. In the WS technique four animals were positive, all from kidney samples.
240 They were seropositive to serovar Hardjo with titers 400 (n=3) and 1600 (n=1). None of
241 the animals had positive results for liver samples with the WS technique. Six animals
242 were positive by cPCR, all from kidneys samples. These animals were seropositive to
243 serovar Hardjo, and presented titers 200 (n=1), 400 (n=4) and 1600 (n=1). None of the
244 liver samples were positive by cPCR. The four animals positive in the WS technique
245 were also positive in cPCR. In qPCR 11 animals were positive for kidney (n=8) or liver
246 samples (n=3). Among them, 8 were seropositive to serovar Hardjo with titers 200
247 (n=2), 400 (n=5) and 1600 (n=1), one to serovar Hebdomadis with titer 100, and two
248 were seronegative. None of the animals were positive by qPCR for both kidney and

249 liver samples. All the positive animals in cPCR and the WS technique were also
250 positive in qPCR. These results are summarized in table 1.

251 The qPCR had the highest sensitivity, followed by cPCR, the WS technique and
252 bacteriological culture. The results of the association between the different techniques
253 are shown in Tables 2 and 3. There was a positive correlation between the MAT titers
254 and the bacterial load of leptospires in the kidneys of seropositive sheep for serovar
255 Hardjo and variant Hardjo C.T.G, with $P < 0.05$ (Table 4). The values of *Leptospira*
256 spp. quantification in the liver ranged from 1.7 to 8.2 bact/ μ L (Md 4.32 bact/ μ L), and in
257 the kidney from 5.2 to 98.3 bact/ μ L (Md 36.67 bact/ μ L) (Tables 1 and 5). The values
258 for the two seronegative animals positive in qPCR were 39.5 and 98.3 bact/ μ L.

259

260 4. Discussion

261 Infection by *Leptospira* spp. in sheep is very common worldwide. The present
262 study revealed a low seroprevalence when compared to other serologic surveys
263 conducted in this species in Brazil, where up to 47% of the animals may be positive
264 (Herrmann et al., 2004; Lilenbaum et al., 2009; Carvalho et al., 2011; Martins et al.,
265 2011; Da Silva et al., 2012). But low seroprevalence has also been observed (Langoni et
266 al., 1995; Seixas et al., 2011), especially in other countries (Motie and Myers, 1986;
267 Zamora et al., 1999; Ciceroni et al., 2000), indicating that the epidemiology of the
268 disease is complex, and varies greatly according to the region of the study. Comparison
269 of data from different surveys is not convenient because of several factors that are
270 involved in each study, and mainly because the prevalence obtained by MAT depends
271 on the number of serovars that are used.

272 Most of the animals reacted to serovar Hardjo, but we cannot state that this was
273 the serovar responsible for the infection, because cross-reaction with other serovars can

274 occur, especially with those that belong to the same serogroup (Levett, 2001). Thus, one
275 can conclude that most of the seropositive animals had contact with leptospire that
276 belongs to the Sejroe serogroup. According to Lilenbaum et al. (2009), this serogroup is
277 responsible for a great number of infections in sheep flocks, causing reproductive
278 disorders and chronic renal infection. Various other studies have reported a high
279 frequency of seropositivity to Hardjo serovar (Motie and Myers, 1986; Ciceroni et al.,
280 2000; Herrmann et al., 2004; Lilenbaum, et al., 2009; Seixas et al., 2011), which
281 demonstrates that sheep can act as a primary reservoir for leptospire included in this
282 serogroup. The results indicate that the studied animals, and probably their flocks of
283 origin, were at risk of developing leptospirosis, as well as of transmitting leptospire to
284 other animals and humans.

285 The bacteriological culture did not present positive results in any sample. This
286 technique is considered of low sensitivity, laborious and time consuming (Boqvist et al.,
287 2003; Grooms and Bolin, 2005; Fearnley et al., 2008; Lilenbaum et al., 2009). The
288 frequency of isolates is usually low (Azevedo et al., 2004; Lilenbaum et al., 2008;
289 Lilenbaum et al., 2009), and possibly no positive results are obtained (Harkin et al.,
290 2003; Fearnley et al., 2008), regardless of the species studied. The 5-fluorouracil is
291 frequently employed to culture leptospire, which aims to reduce contamination risks.
292 We did not use this antimicrobial in the present study because there is evidence that
293 Fletcher media annul the inhibitory effect of 5-fluorouracil (Ris, 1974), and its use is
294 more appropriate in EMJH media. Studies involving the efficiency of antimicrobials for
295 culturing leptospire are scarce, and it is uncertain if the 5-fluorouracil could provide
296 positive results in our study. The results confirm that, despite the high specificity, the
297 bacteriological culture is a technique of low sensitivity, and it is not recommended for

298 early diagnosis of leptospirosis. Its use should be recommended when there is a need to
299 isolate living leptospires, such as in studies involving the pathogenicity of the bacteria.

300 The WS technique is infrequently used in leptospirosis diagnostic. Some studies
301 have demonstrated its efficiency for detecting leptospires in different tissues and
302 different species, such as horses, dogs, sheep, pigs and men (Chappel et al., 1992; Brito
303 et al., 1996; Sebastian et al., 2005; León et al., 2006; Ortega-Pacheco et al., 2008). Only
304 a few studies analyzing the efficiency of this technique for detecting leptospires have
305 been carried out (Hunter et al., 1987; Chappel et al., 1992), and they revealed a low
306 frequency of positive results. The WS technique performed well only against
307 bacteriological culture, while the remaining tests were more successful. Considering the
308 present results, the need for animal tissue, people with expertise to interpret the results,
309 and the time taken to complete, this technique is also not recommended for the early
310 diagnosis of leptospirosis. The main advantage presented by the WS technique is that it
311 allows the direct visualization of the bacteria in the animal tissue, and should be
312 recommended for studies with this purpose.

313 The cPCR performed better than bacteriological culture and the WS technique.
314 Despite the different PCR techniques that can be used for this purpose, previous studies
315 have demonstrated its efficiency for diagnosing leptospirosis in several animal species,
316 as well as in different samples, such as blood, urine, semen and kidney (Heinemann et
317 al., 1999; Merien et al., 1995; Cameron et al., 2008; Hernández-Rodríguez et al., 2011).
318 When compared to traditional techniques, like dark field microscopy and bacteriological
319 culture, the PCR has demonstrated superior results (Harkin et al., 2003; Lilenbaum et
320 al., 2009; Hernández-Rodríguez et al., 2011), as observed in our study. The diagnosis of
321 leptospirosis in sheep by PCR is rare, and this is one of the first studies using tissue

322 samples for this purpose in this species. This technique is considered rapid and sensitive
323 (Kee et al., 1994), presenting a great advantage for the early diagnosis of leptospirosis.

324 The qPCR was the most sensitive of the tests. Previous studies have reported that
325 this technique can detect extremely low levels of leptospiral DNA (Merien et al., 2005;
326 Ahmed et al., 2009). Diagnostic of leptospirosis by qPCR is common in humans
327 (Merien et al., 2005; Bourhy et al., 2011; Thaipadunpanit et al., 2011), and studies in
328 domestic animals are scarce. We found no data regarding its use in the diagnosis of
329 leptospirosis in sheep. The qPCR presented a lower specificity than the other tests, but
330 this should not be interpreted as a possible false negative result. It is more probable that
331 the two seronegative animals, positive in qPCR, were in the acute phase of infection,
332 when serology may give negative results because the organism has still not produced
333 antibodies (Levett, 2001, Merien et al., 2005). This fact is reinforced by the DNA
334 quantification resulting from qPCR, because these two samples presented high
335 quantities of leptospiral DNA when compared to the remaining positive samples (Table
336 5), which is characteristic of acute infection. The positive correlation observed between
337 MAT and qPCR indicates that high titers for serovar Hardjo and for variant Hardjo
338 C.T.G. results in high quantities of leptospiral DNA in the kidneys of sheep. The main
339 disadvantage of qPCR is its high cost, and only a few laboratories can perform this test.

340 This study aimed to compare different samples to detect *Leptospira* spp.. The liver
341 was chosen because it is the second most affected organ during the leptospiremia phase
342 (Greene et al., 2006). The kidney presented higher positivity than the liver in all the
343 tests, which can be justified by the DNA quantification obtained by qPCR. Probably the
344 higher quantity of bacteria in the kidney results in the greater positivity of this organ in
345 leptospirosis diagnosis. Marinho et al. (2006) found similar results in a study with
346 hamsters experimentally infected with *L. interrogans* serovar Canicola.

347 5. Conclusion

348 The present study detected *Leptospira* spp. in tissues samples from naturally
349 infected sheep, especially those from the Sejroe serogroup. The quantitative PCR is an
350 efficient tool for leptospirosis diagnosis, contributing to prevention measures in both
351 animals and humans. The kidney has higher concentrations of leptospires than the liver
352 in naturally infected sheep.

353

354 6. Acknowledgements

355 We are thankful to the São Paulo Research Foundation - FAPESP (Process
356 FAPESP # 2009/11686-5 and 2009/02393-4) and The National Council for Scientific
357 and Technological Development - CNPq (Edital MCT/CNPq/CT - Agronegócio
358 n.17/2010 – Process CNPq # 558914/2010-1) for financial support; to workers and
359 students from NUPEZO for their assistance in sampling the animals; and to the
360 slaughterhouse for allowing the study.

361

362 7. Conflict of interest

363 All authors declare that they have no financial or personal relationships with other
364 people or organizations that could inappropriately influence their work.

365

366 8. References

367 Adler, B., Moctezuma, A.P., 2010. *Leptospira* and leptospirosis. Vet. Microbiol. 140,
368 287-296.

- 369 Ahmed, A., Engelberts, M.F.M., Boer, K.R., Ahmed, N., Hartskeerl, R.A., 2009.
370 Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic *Leptospira*
371 species in clinical materials. PLoS ONE 4, e7093.
- 372 Azevedo, S.S., Alves, C.J., Andrade, J.S.L., Santos, F.A., Freitas, T.D., Batista, C.S.A.,
373 2004. Isolation of *Leptospira* spp. from kidneys of sheep at slaughter. Cienc. Rural 71,
374 383-385.
- 375 Boqvist, S., Montgomery, J.M., Hurst, M., Ho Thi Viet Thu, Olsson Evengall, E.,
376 Gunnarsson, A., Magnusson, U., 2003. *Leptospira* in slaughtered fattening pigs in
377 southern Vietnam: presence of the bacteria in kidneys and association with
378 morphological findings. Vet. Microbiol. 93, 361-368.
- 379 Brasil, 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Serviço de Inspeção
380 Sanitária Federal. Quantidade de abate estadual por ano e espécie. Available in
381 <extranet.agricultura.gov.br/sigsif_cons/lap_abate_estaduais_cons> on Jan. 20, 2009.
- 382 Brito, T., Sandoval, M.P., Silva, A.G., Saad, R.C., Colaiacovo, W., 1996. Intestinal
383 spiroquetosis: first cases reported in Brazil and the use of immunohistochemistry as an
384 aid in histopathological diagnosis. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 38, 45-53.
- 385 Cameron, C.E., Zuerner, R.L., Raverty, S., Colegrove, K.M., Norman, S.A., Lambourn,
386 D.M., Jeffries, S.J., Gulland, F.M., 2008. Detection of pathogenic *Leptospira* bacteria in
387 Pinniped populations via PCR and identification of a source of transmission for
388 zoonotic leptospirosis in the marine environment. J. Clin. Microbiol. 46, 1728-1733.
- 389 Carvalho, S.M., Gonçalves, L.M.F., Macedo, N.A., Goto, H., Silva, S.M.M.S., Mineiro,
390 A.L.B.B., Kanashiro, E.H.Y., Costa, F.A.L., 2011. Infecção por leptospiros em ovinos e
391 caracterização da resposta inflamatória renal. Pesq. Vet. Bras. 31, 637-642.
- 392 CDC, 2008. Epi Info 3.5.1. Available in <www.cdc.gov/epiinfo> Access on Aug. 14,
393 2009.

- 394 Chappel, R.J., Prime, R.W., Millar, B.D., Mead, L.J., Jones, R.T., Adler, B., 1992.
395 Comparison diagnostic procedures for porcine leptospirosis. *Vet. Microbiol.* 30, 151-
396 163.
- 397 Ciceroni, L., Lombardo, D., Pinto, A., Ciarrocchi, S., Simeoni, J., 2000. Prevalence of
398 antibodies to *Leptospira* serovars in sheep and goats in Alto Adige-South Tyrol. *J. Vet.*
399 *Med.* 47, 217-223.
- 400 Cumberland, P.C., Everard, C.O.R., Levett, P.N., 1999. Assessment of the efficacy of
401 the IgM enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and microscopic agglutination
402 test (MAT) in the diagnosis of acute Leptospirosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61, 630-
403 634.
- 404 Da Silva, R.C., Costa, V.M., Shimabukuro, F.H., Richini-Pereira, V.B., Menozzi, B.D.,
405 Langoni, H., 2012. Frequency of *Leptospira* spp. in sheep from Brazilian
406 slaughterhouses and its association with epidemiological variables. *Pesq. Vet. Bras.* In
407 Press.
- 408 Faine, S., B. Adler, C. Bolin, P. Perolat., 1999. *Leptospira* spp. and leptospirosis.
409 MediSci, Melbourne, pp. 113-122, 123-129.
- 410 Fearnley, C., Wakley, P.R., Gallego-Beltran, J., Dalley, C., Williamson, S., Gaudie, C.,
411 Woodward, M.J., 2008. The development of a real time PCR to detect pathogenic
412 *Leptospira* species in kidney tissue. *Res. Vet. Sci.* 85, 8-16.
- 413 Greene, C.E., Skykes, J.E., Brown, C.A., Hartmann, K., 2006. Leptospirosis. In:
414 Greene, C.E. (Ed.), *Infectious diseases of the dog and cat*. Elsevier, St. Louis, pp.402-
415 417.
- 416 Grooms, D.L., Bolin, C.A., 2005. Diagnosis of fetal loss caused by bovine viral diarrhea
417 virus and *Leptospira* spp.. *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.* 21, 463-472.

- 418 Harkin, K.R., Roshto, Y.M., Sullivan, J.T., Purvis, T.J., Cheengappa, M.A., 2003.
 419 Comparison of polymerase chain reaction assay, bacteriologic culture, and serologic
 420 testing in assessment of prevalence of urinary shedding of leptospires in dogs. J. Am.
 421 Vet. Med. Assoc. 222, 1230-1233.
- 422 Heinemann, M.B., Garcia, J.F., Nunes, C.M., Morais, Z.M., Gregori, F., Cortez, A.,
 423 Vasconcellos, S.A., Visintin, J.A., Richtzenhain, L.J., 1999. Detection of leptospires in
 424 bovine semen by polymerase chain reaction. Aust. Vet. J. 77, 32-34.
- 425 Hernández-Rodríguez, P., Díaz, C.A., Dalmau, E.A., Quintero, G.M., 2011. A
 426 comparison between polymerase chain reaction (PCR) and traditional techniques for the
 427 diagnosis of leptospirosis in bovines. J. Microbiol. Methods 84, 1-7.
- 428 Herrmann, G.P., Lage, A.P., Moreira, E.C., Haddad, J.P.A., Resende, J.R., Rodrigues,
 429 R.O., Leite, R.C., 2004. Soroprevalência de aglutininas anti-*Leptospira* spp. em ovinos
 430 nas Mesorregiões Sudeste e Sudoeste do Estado Rio Grande do Sul, Brasil. Cienc.
 431 Rural, 34, 443-448.
- 432 Hunter, P., Van Der Vyver, F.H., Selmer-Olsen, A., Henton, M.M., Herr, S., De Lange,
 433 J.F., 1987. Leptospirosis as cause of “white spots” kidneys in South African pig
 434 abattoirs. Onderstepoort J. Vet. Res. 54, 59-62.
- 435 Kee, S., Kim, I., Choi, M., Chang, W., 1994. Detection of Leptospiral DNA by PCR. J.
 436 Clin. Microbiol. 32, 1035-1039.
- 437 Langoni, H., Marinho, M., Baldini, S., Da Silva, A.V., Cabral, K.G., Da Silva, E.D.
 438 Pesquisa de aglutininas antileptospíricas em soros de ovinos no Estado de São Paulo,
 439 Brazil, utilizando-se as provas de macroaglutinação em placa e soroaglutinação
 440 microscópica. Ver. Bras. Med. Vet., 17, 264-268, 1995.

- 441 Langoni, H., Souza, L.C., Silva, A.V., Luvizotto, M.C.R., Paes, A.C., Lucheis, S.B.
442 Incidence of leptospiral abortion in Brazilian dairy cattle. *Prev. Vet. Med.*, 40, 271-275,
443 1999.
- 444 Léon, A., Pronost, S., Tapprest, J., Foucher, N., Blanchard, B., André-Fontaine, G.,
445 Laugier, C., Fortier, G., Leclercq, R. 2006. Identification of pathogenic *Leptospira*
446 strains in tissues of a premature foal by use of polymerase chain reaction analysis. *J.*
447 *Vet. Diagn. Invest.* 18, 218-221.
- 448 Levett, P.N., 2001. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 296-326.
- 449 Lilenbaum, W., Vargas, R., Ristow, P., Cortez, A., Souza, S.O., Richtzenhaim, L.J.,
450 Vasconcellos, S.A., 2009. Identification of *Leptospira* spp. carriers among seroreactive
451 goats and sheep by polymerase chain reaction. *Res. Vet. Sci.* 87, 16-19.
- 452 Mackinnon, A., 2000. A spreadsheet for the calculation of comprehensive statistics for
453 the assessment of diagnostic tests and inter-rater agreement. *Comput. Biol. Med.* 30,
454 127-134.
- 455 Martins, G., Penna, B., Hamond, C., Leite, R.C., Silva, A., Ferreira, A., Brandão, F.,
456 Oliveira, F., Lilenbaum, W. Leptospirosis as the most frequent infectious disease
457 impairing productivity in small ruminants in Rio de Janeiro, Brazil. *Trop. Anim. Health*
458 *Prod.*, Epub ahead of print, 2011.
- 459 Marinho, M., Silva, C., Lima, V.M.F., Peirí, J.R., Perri, S.H.V., 2006. Cytokine and
460 antibody production during murine leptospirosis. *J. Ven. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*
461 12, 595-603.
- 462 Merien, F., Amouriaux, P., Perolat, P., Baranton, G., Saint Girons, I., 1992. Polymerase
463 chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.*
464 30, 2219-2224.

- 465 Merien, F., Portnoi, D., Bourhy, P., Charavay, F., Berlioz-arthaud, A., Baranton, G.,
 466 2005. A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human
 467 leptospirosis. FEMS Microbiol. Lett. 249, 139-147.
- 468 Motie, A., Myers, D.M., 1986. Leptospirosis in sheep and goats in Guyana. Trop. Anim.
 469 Health Prod. 118, 113-114.
- 470 Ortega-Pacheco, A., Colin-Flores, R.F., Gutiérrez-Blanco, E., Jiménez-Coello, M.,
 471 2008. Frequency and type of renal lesions in dogs naturally infected with *Leptospira*
 472 species. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1149, 270-274.
- 473 Ris, D.R., 1974. Limitations of the use of 5-fluoruracil as a selective agent for the
 474 isolation of leptospirae. Appl. Microbiol. 27, 270-271.
- 475 Sebastian, M., Giles, R., Roberts, J., Poonacha, K., Harrison, L., Donahue, J.,
 476 Benirschke, K., 2005. Funisitis associated with leptospiral abortion in an equine
 477 placenta. Vet. Pathol. 42, 659-662.
- 478 Seixas, L.S., Melo, C.B., Leite, R.C., Moreira, E.C., McManus, C.M., Castro, M.B.,
 479 2011. Anti-*Leptospira* sp. agglutinins in ewes in the Federal District, Brazil. Trop.
 480 Anim. Health Prod. 43, 9-11.
- 481 Thaipadunpanit, J., Chierakul, W., Wuthiekanum, V., Limmathurotsakul, D.,
 482 Amornchai, P., Boonslip, S., Smythe, L.D., Roongrueng, L., Limpai boon, R.,
 483 Hoffmaster, A.R., Day, N.P.J., Peacock, S.J., 2011. Diagnostic accuracy of real-time
 484 PCR assays targeting 16S rRNA and *lipL32* genes for human leptospirosis in Thailand: a
 485 case control study. PLoS ONE 6, e16236.
- 486 Wagenaar, J., Zuerner, R.L., Alt, D., Bolin, C.A., 2000. Comparison of polymerase
 487 chain reaction assays with bacteriologic culture, immunofluorescence, and nucleic acid
 488 hybridization for detection of *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo in urine of
 489 cattle. Am. J. Vet. Res. 61, 316-320.

- 490 World Health Organization (WHO), 2003. Human leptospirosis: guidance for diagnosis,
491 surveillance and control. Malta, pp. 63-76.
- 492 Zamora, J., Riedemann, S., Tadich, N., 1999. A serological survey of leptospirosis in
493 sheep in Chile. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 42, 73-76.
- 494

Table 1. Results of cPCR, qPCR, bacteriological culture and the WS technique performed in kidney and liver samples of slaughtered seropositive sheep from Brazil.

Animal	Titer / Serovar ^a	cPCR ^b	qPCR ^c	Bact. culture ^d	WS technique ^e
A-112	100 - Hardjo (C.T.G.)	-	-	-	-
A-150	1600 - Hardjo (C.T.G.)	+ K	+ K (33,7)	-	+ K
A-171	400 - Hardjo (Pra.)	+ K	+ K (61,9)	-	+ K
A-173	400 - Hardjo (C.T.G., Pra.)	+ K	+ K (13,5)	-	+ K
A-174	400 - Hardjo (C.T.G.)	+ K	+ K (61,8)	-	+ K
A-213	1600 - Hardjo (Pra.)	-	-	-	-
A-215	400 - Hardjo (C.T.G.)	+ K	+ K (28,8)	-	-
A-229	200 - Hardjo (C.T.G.)	-	+ L (4,3)	-	-
A-237	100 - Hardjo (Pra.)	-	-	-	-
A-245	400 - Hardjo (C.T.G.)	-	+ L (8,2)	-	-
A-247	200 - Hardjo (C.T.G., Pra.)	+ K	+ K (5,2)	-	-
A-256	100 – Hebdomadis	-	-	-	-
A-259	100 – Shermani	-	-	-	-
A-323	100 – Hebdomadis	-	+ L (1,7)	-	-
A-344	100 – Hebdomadis	-	-	-	-
A-346	100 – Wolfii	-	-	-	-
A-350	100 - Hebdomadis	-	-	-	-
A-414	400 – Hebdomadis	-	-	-	-
A-460	100 – Sentot	-	-	-	-
A-461	100 – Sentot	-	-	-	-
A-467	1600 - Hardjo (C.T.G., Pra.)	-	-	-	-

497

498 ^a Microscopic Agglutination Test (MAT)499 ^b Conventional PCR500 ^c Quantitative PCR (bacteria/μL)501 ^d Bacteriological culture

- 502 ^e Warthin Starry technique
- 503 C.T.G.: Hardjo C.T.G.
- 504 Pra: Hardjo Prajitno
- 505 **K**: kidney sample
- 506 **L**: liver sample
- 507 *bacteria/ μ L

Table 2. Association between MAT and bacteriological culture, the WS technique, cPCR and qPCR for detecting *Leptospira* spp. in kidney and liver samples of slaughtered seropositive sheep from Brazil.

MAT	Bacteriological culture ^a			WS technique ^b			cPCR ^c			qPCR ^d		
	Negative	Positive	Total	Negative	Positive	Total	Negative	Positive	Total	Negative	Positive	Total
Non reagent	15	0	15	15	0	15	15	0	15	13	2	15
Reagent	21	0	21	17	4	21	15	6	21	12	9	21
Total	36	0	36	32	4	36	30	6	36	25	11	36

McNemar test (SE: sensitivity; SP: specificity; PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value)

^a $\chi^2 = 19.05$; value of $P = 0.0000$; $\kappa = 0.0000$ (0.0000-0.0000); SE=0.0%; SP=100.0%; PPV=not determined; NPV=41.7%

^b $\chi^2 = 15.06$; value of $P = 0.0001$; $\kappa = 0.1639$ (0.0055-0.3223); SE=19.1%; SP=100.0%; PPV=100.0%; NPV=46.9%

^c $\chi^2 = 13.07$; value of $P = 0.0003$; $\kappa = 0.2500$ (0.0978-0.5830); SE=28.6%; SP=100.0%; PPV=100.0%; NPV=50.0%

^d $\chi^2 = 5.79$; value of $P = 0.0162$; $\kappa = 0.2696$ (0.0096-0.5295); SE=42.9%; SP=85.7%; PPV=81.8%; NPV=52.0%

MAT: Microscopic Agglutination Test

WS technique: Warthin Starry technique

518 qPCR: quantitative PCR

519 cPCR: conventional PCR

Table 3. Association between qPCR and bacteriological culture, the WS technique and cPCR to detect *Leptospira* spp. in kidney and liver samples of slaughtered seropositive sheep from Brazil.

qPCR	Bacteriological culture ^a			WS technique ^b			cPCR ^c		
	Negative	Positive	Total	Negative	Positive	Total	Negative	Positive	Total
Negative	25	0	25	25	0	25	25	0	25
Positive	11	0	11	7	4	11	5	6	11
Total	36	0	36	32	4	36	30	6	36

McNemar test (SE: sensitivity; SP: specificity; PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value)

^a $\chi^2 = 9.09$; value of $P = 0.0026$; $\kappa = 0.0000$ (0.0000-0.0000); SE=0.0%; SP=100.0%; PPV=not determined; NPV=69.4%

^b $\chi^2 = 5.14$; value of $P = 0.0233$; $\kappa = 0.4425$ (0.1347-0.7502); SE=36.4%; SP=100.0%; PPV=100.0%; NPV=78.1%

^c $\chi^2 = 3.20$; value of $P = 0.0736$; $\kappa = 0.6250$ (0.3422-0.9078); SE=54.6%; SP=100.0%; PPV=100.0%; NPV=83.3%

qPCR: quantitative PCR

WS technique: Warthin Starry technique

cPCR: conventional PCR

Table 4. Correlation between antibody titers in the MAT, serovar independent, specific to the most frequent serovars, and specific to the most frequent Hardjo variants, and the concentrations of *Leptospira* spp. DNA in kidney and liver samples of slaughtered seropositive sheep from Brazil.

Variable pair	r coefficient	P value ($\alpha=5\%$)	Interpretation
MAT x qPCR – kidney	0.3162	0.0602	Moderate correlation
MAT x qPCR – liver	0.2296	0.1779	Weak correlation
MAT (Hardjo) x qPCR - liver	0.1809	0.2910	Weak correlation
MAT (Hardjo) x qPCR - kidney	0.4367	0.0077	Moderate correlation
MAT (CTG) x qPCR - kidney	0.5228	0.0104	Moderate correlation
MAT (CTG) x qPCR - liver	0.3214	0.1347	Moderate correlation
MAT (Pra) x qPCR - kidney	0.3042	0.1799	Moderate correlation
MAT (Pra) x qPCR - liver	-	-	-

MAT: Microscopic Agglutination Test

MAT (CTG): samples reagent to serovar Hardjo C.T.G, excluding all the remaining reagent samples

MAT (Pra): samples reagent to serovar Hardjo prajitno, excluding all the remaining reagent samples

- 537 qPCR - kidney: results of kidney samples by quantitative PCR
- 538 qPCR - liver: results of liver samples by quantitative PCR
- 539

Table 5. Median (Md), percentile 25% (P25) and 75% (P75) of bacterial load (bacteria/ μ L) calculated by qPCR in kidney and liver samples of slaughtered seropositive sheep originating from Brazil.

Tissue	Median	Percentile 25%	Percentile 75%
Kidney	36.67	25.04	61.89
Liver	4.32	3.05	6.29