

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

**Deteccção de DNA leptospiral em amostras de urina de bovinos assintomáticos
abatidos em frigorífico de Pelotas (RS)**

Gustavo Afra Mazza

Pelotas, 2023

Gustavo Afra Mazza

**Detecção de DNA leptospiral em amostras de urina de bovinos assintomáticos
abatidos em frigorífico de Pelotas (RS)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

Pelotas, 2023

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação da Publicação

M477d Mazza, Gustavo Afra

Detecção de DNA leptospiral em amostras de urina de bovinos assintomáticos abatidos em frigorífico de Pelotas (RS) [recurso eletrônico] / Gustavo Afra Mazza ; Éverton Fagonde da Silva, orientador. — Pelotas, 2023.
40 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2023.

1. Leptospirose. 2. Diagnóstico Molecular. 3. Zoonose. 4. Epidemiologia. I. Silva, Éverton Fagonde da, orient. II. Título.

CDD 636.2089695

Gustavo Afra Mazza

Detecção de DNA leptospiral em amostras de urina de bovinos assintomáticos
abatidos em frigorífico de Pelotas (RS)

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em
Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária,
Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 20/03/2023

Banca examinadora:

Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva (Orientador)
Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia dos Santos da Conceição
Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

Prof. Dr. Rodrigo Casquero Cunha
Doutor em Ciência Animal pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

Prof. Dr. Amilton Clair Pinto Seixas Neto
Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

À minha mãe e aos meus avós, por irem sempre além da suficiência.

Agradecimentos

Agradeço à Deus e às bênçãos do Universo. Não apenas em relação a mim e à minha trajetória, e sim, por ter abençoado a todos que amo com saúde na travessia deste período caótico e pandêmico que passamos, que ainda dói em tantas pessoas que não podem abraçar àqueles que amam nos dias de hoje.

Agradeço às situações e escolhas da vida que me trouxeram até aqui, a este momento, depois de muito absorver conhecimento e experiências, sempre acompanhado de pessoas ótimas e de bom coração.

Agradeço à minha mãe, Denise da Silva Afra, por ser simplesmente o melhor ser humano que já pisou neste Planeta. Sem muitas palavras. Minha vida pela tua.

Agradeço aos meus avós, por estarem empatados na 2ª posição de melhores seres humanos que já pisaram neste Planeta.

Agradeço à minha namorada, Camila, por ter sido uma ótima companhia que muito me apoiou, acolheu e me distraiu nos momentos de maiores cobranças, tornando muito mais leve a minha caminhada.

Agradeço ao meu pai e ao meu tio que, mesmo de longe, sempre se fizeram presentes durante os caminhos que trilhei e venho trilhando.

Ao meu orientador Professor Dr. Éverton, que neste período muito me ensinou. E não somente na parte da docência. Nunca perdeu a fé em mim e sempre se manteve preocupado com o meu bem-estar e das pessoas que amo. Levarei para o resto da vida - e não apenas como orientador. Levarei como mentor, “Elemestre”, paizão. Um amigo.

Agradeço ao Kauê, por ter dividido comigo todo seu vasto conhecimento na Biologia Molecular, sempre incentivando a buscar mais e mais.

A todos os meus amigos. Aos mais antigos e aos que chegaram a pouco tempo. O apoio de vocês e, principalmente, os momentos de descontração foram uma válvula de escape que vocês nem imaginam.

***“Keep ‘Yah’ Head Up”
Tupac Shakur***

Resumo

MAZZA, Gustavo Afra. **Detecção de DNA leptospiral em amostras de urina de bovinos assintomáticos abatidos em frigorífico de Pelotas (RS)**. 2023. 40f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2023.

A leptospirose é uma doença infecciosa de caráter zoonótico causada por espiroquetas do gênero *Leptospira*. No Brasil, a leptospirose bovina é endêmica e considerada uma doença que causa severas perdas econômicas nos rebanhos. O teste de soraglutinação microscópica (MAT) é o teste de referência no diagnóstico da doença, mas é insuficiente na detecção de portadores. Assim, o objetivo deste trabalho foi realizar, por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), a detecção de DNA leptospiral presente em urina de bovinos assintomáticos abatidos na cidade de Pelotas, RS, Brasil. Para a realização da PCR, foram coletadas 123 amostras de urina de bovinos assintomáticos de bovinos pertencentes a oito municípios da região sul do Estado do Rio Grande do Sul (RS). O DNA genômico (gDNA) foi extraído por meio do método Brazol, seguindo as instruções do fabricante e a PCR foi o método molecular realizado para a amplificação dos genes que codificam para a proteína de membrana externa LipL32 e para a fração 16S do ribossomo da leptospira. Após a amplificação, as amostras obtidas foram submetidas à eletroforese e o resultado foi avaliado em transiluminador, aparelho que nos permite visualizar através de luz UV a amplificação do DNA alvo da pesquisa. Das 123 amostras, 20 (16,3%) amplificaram DNA genômico que codifica para a proteína LipL32 e 23 (18,7%) amplificaram para o 16SRNA. Este trabalho revela perspectivas importantes sobre um contexto de saúde única que os bovinos abatidos na cidade de Pelotas podem ser uma fonte potencial de leptospirose para humanos e outros animais de importância na disseminação para o ambiente. Além disso, a PCR no formato aqui empregada pode ser utilizada para a detecção de DNA leptospiral em bovinos de corte assintomáticos provenientes da região Sul do Rio Grande do Estado e abatidos em frigoríficos de Pelotas, RS, Brasil.

Palavras-chave: leptospirose; diagnóstico molecular; zoonose; epidemiologia

Abstract

MAZZA, Gustavo Afra. **Leptospiral DNA detection in urine of asymptomatic cattle slaughtered in a slaughterhouse of Pelotas**. 2023. 40f. Dissertation (Master degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2023.

Leptospirosis is a zoonosis caused by spirochetes of the *Leptospira* genus. In Brazil, bovine leptospirosis is endemic and considered a disease that causes severe economic losses in herds. Microscopic agglutination test (MAT) remains the reference test for the diagnosis of leptospirosis but is inadequate for the detection of carrier cattle status. Thus, the objective of this work was to perform a Polymerase Chain Reaction (PCR) to detect leptospiral DNA in the urine of asymptomatic cattle slaughtered in Pelotas city. To perform PCR, 123 urine samples were collected from asymptomatic cattle belonging to eight municipalities in the southern region of the State of Rio Grande do Sul (RS). Genomic DNA (gDNA) was extracted using the Brazol method, following the manufacturer's instructions and PCR was used for amplification of genes encoding for the outer membrane protein LipL32 and for the 16S fraction of the ribosome (16SRNA) of leptospires. After amplification, the samples obtained were submitted to electrophoresis and the result was evaluated in a transilluminator. Of the 123 samples, 20 (16.3%) amplified gDNA encoding for LipL32 protein and 23 (18.7%) amplified for 16SRNA. This work reveals important insights into a one health context that bovines slaughtered in Pelotas city may be a potential source of leptospirosis for humans, animals and environment. Moreover, PCR in the format employed here may be used for the leptospiral DNA detection in asymptomatic beef cattle in slaughterhouse of Pelotas.

Keywords: leptospirosis; molecular diagnosis; zoonosis; epidemiology

Lista de Figuras

Artigo 1

Figura 1	Fluxograma demonstrativo da realização do método de triagem utilizado para a obtenção de resultados na pesquisa de artigos para a revisão bibliográfica.....	19
----------	--	----

Sumário

1 Introdução.....	10
2 Objetivos.....	13
2.1 Objetivo geral.....	13
2.2 Objetivos específicos.....	13
3. Hipóteses.....	14
3.1 Hipótese 1.....	14
3.2 Hipótese 2.....	14
4 Artigos.....	15
4.1 Artigo 1.....	15
4.2 Artigo 2.....	25
5 Considerações Finais.....	34
Referências.....	35

1 Introdução

A leptospirose é uma doença causada por bactérias da ordem *Spirochaetales*, família *Leptospiraceae* e gênero *Leptospira* (ADLER et al., 2015). Com distribuição global, a doença demonstra-se mais presente em países com climas tropicais ou subtropicais, devido à característica de sobrevivência da bactéria. Com preferência por ambientes úmidos e temperaturas mais quentes, pode tornar-se uma doença sazonal, com casos de surtos em períodos de alta pluviosidade ou também pode apresentar características endêmicas com casos constantes em regiões que apresentem tais condições climáticas (PLANK & DEAN, 2000; BRASIL, 2007; DREYFUS et al., 2021).

Segundo THIBEAUX et al. (2018), esta bactéria separa-se em 25 espécies, divididas e determinadas pelo parentesco genético. Estas espécies podem ser então classificadas em saprófitas, intermediárias e patogênicas. A classificação das leptospirosas se dá por meio de sorologia ou de biologia molecular. Cada subdivisão é denominada sorovar e, hoje em dia, conta-se com mais de 300 sorovares conhecidos e agrupados em diferentes sorogrupos (BHARTI et al., 2003; DREYFUS et al., 2021). Com uma vasta gama de sorovares, a bactéria consegue, então, manter diferentes espécies de mamíferos como hospedeiros de eleição, variando conforme o sorovar (ADLER et al., 2015). Na espécie bovina, após diversos estudos e testes sorológicos em rebanhos, o sorogrupo Hardjo, principalmente os sorovares Hardjobovis e Hardjopratiño, pôde ser definido como o predominante, atingindo altos índices de prevalência. Além destes, os sorovares Pomona e Grippotyphosa também podem desenvolver quadros clínicos na espécie (FAVERO et al., 2001; LILENBAUM & SOUZA, 2003; BATISTA et al., 2005; THOMPSON et al., 2006; LAGE et al., 2007; MILLER et al., 1991; RAJEEV et al., 2014).

Quando há a ocorrência da doença em animais de produção como bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos, o maior impacto causado pela leptospirose está na relação econômica-produtiva que é importantemente prejudicada. (BRASIL, 1995). Os principais canais de produção afetados estão na capacidade reprodutiva (abortos,

infertilidade), nascimento de animais fracos, diminuição temporária na produção de leite e diminuição na conversão alimentar (CERVANTES et al., 2002). O prejuízo torna-se crescente, inclusive, devido ao contínuo aumento que há na produção, consumo, comércio e exportação de carne, propriamente dita, bem como de animais vivos (DEWES et al., 2020). Tratando-se da manifestação da doença em seres humanos, uma vez detectada, torna-se de notificação compulsória e pode inclusive levar ao óbito em casos agudos (Brasil, 2005).

A transmissão da bactéria entre bovinos se dá principalmente de forma direta, ou seja, de animal infectado para animal sadio. Transmissão ambiental, indireta, através de solo e de água contaminados, bem como a partir de outras espécies aos bovinos também podem ocorrer, porém, com menor percentual de importância (JAMAS et al., 2020). Segundo NALLY et al. (2018), como característica da bactéria, a colonização ocorre principalmente nos túbulos renais, dando a capacidade de um animal infectado ser também um potencial disseminador da bactéria no ambiente. Isso ocorre inclusive em bovinos, o que aumenta sua importância no ciclo epidemiológico da doença (ADLER et al., 2015). Também segundo o Guia de Vigilância Epidemiológica (2009), animais infectados podem eliminar leptospiros pela urina durante meses, anos ou ainda por toda a vida, variando conforme a espécie animal e o sorovar envolvido.

A infecção nos seres humanos pode ocorrer através do contato direto, mas ocorre principalmente através do contato indireto, tendo como meio infectante a água e solo contaminados (DE BRITO et al., 2018). Os principais transmissores da bactéria patogênica são os roedores sinantrópicos, como *Rattus norvegicus* (rato de esgoto), *Rattus rattus* (rato preto) e *Mus musculus* (camundongos), pois são portadores assintomáticos da bactéria e, com isso, tornam-se um grande reservatório do microrganismo com alto potencial de disseminador (KARPAGAM & GANESH, 2020).

O teste diagnóstico da doença é feito principalmente por meio de soroaglutinação microscópica (MAT), determinado como o padrão ouro para a enfermidade (OIE, 2021). O teste consiste em detectar anticorpos com ação anti*Leptospira* e apresenta sensibilidade de 98% e especificidade de 97% após a quarta semana de infecção (PINTO, 2015). Porém existe ainda o risco de apresentar falso positivo devido a detecção de anticorpos vacinais, na fase aguda, apresenta reações cruzadas entre sorogrupos, e só reage com os sorovares contidos no teste que será utilizado (AHMAD et al., 2005; SANTOS, 2006). Ainda, segundo PINTO,

2015, na fase aguda o teste de MAT obtém sensibilidade de apenas 41%, tornando-o limitado no diagnóstico da doença. Por outro lado, a PCR, embora mais laboriosa, torna-se uma satisfatória alternativa de teste diagnóstico por apresentar maior sensibilidade e especificidade, especificamente quanto ao potencial patogênico da bactéria, e também por sua ampla aplicação em diferentes modelos, como utilização da urina ou do material renal (ROY et al., 2005; STODDARD et al., 2009).

No contexto do que foi citado, o presente estudo apresenta o Artigo 1, que é resultado de uma revisão bibliográfica, e que aponta a importância dos métodos moleculares como ferramenta no diagnóstico da leptospirose bovina, e o Artigo 2, que foi desenhado para detectar, através da PCR, fragmentos de DNA dos genes LipL32 e 16S Ribossomal de leptospiros, em amostras de urina coletadas aleatoriamente através da punção direta nas bexigas durante a inspeção post-mortem de bovinos, os quais foram abatidos sem história clínica da doença.

2 Revisão da Literatura

2.1 Objetivo geral

Detectar DNA leptospiral na urina de bovinos assintomáticos abatidos em frigorífico de Pelotas.

2.2 Objetivos específicos

- Coletar amostras de urina, diretamente da bexiga de bovinos, durante a inspeção post-mortem, para detectar DNA leptospiral por meio de PCR;
- Utilizar o método de PCR, realizando testes com os genes LipL32 e 16SRNA, presentes em leptospiros e utilizados amplamente em estudos de taxonomia, diagnóstico e vacinas;
- Realizar uma revisão bibliográfica sobre métodos moleculares utilizados para o diagnóstico da leptospirose.

3 Hipótese

3.1 Hipótese 1

Testes moleculares são ferramentas que, aliados a testes sorológicos, aumentam a acurácia do diagnóstico da leptospirose.

3.2 Hipótese 2

Bovinos abatidos em frigorífico de Pelotas são portadores de leptospirosas, tornando-se potenciais disseminadores do agente através da urina.

4 Artigos

4.1 Artigo 1

**Molecular methods in the diagnosis of bovine leptospirosis: A mini-review
[Métodos moleculares no diagnóstico da leptospirose bovina: Uma mini
revisão]**

Gustavo Afra Mazza; Flávia Aleixo Vasconcellos; Éverton Fagonde da Silva

Submetido à revista Brazilian Archives of Biology and Technology

Molecular methods in the diagnosis of bovine leptospirosis: A mini-review [Métodos moleculares no diagnóstico da leptospirose bovina: Uma mini revisão]

Gustavo Afra Mazza; Flávia Aleixo Vasconcellos; Éverton Fagonde da Silva

RESUMO

A leptospirose é uma doença infecciosa com potencial zoonótico causada por bactérias do gênero *Leptospira*. Quando infecta e desenvolve a enfermidade em bovinos, as consequências estão nos graves prejuízos para todos os envolvidos na cadeia de produção desses animais. Outro fator importante é a mão de obra envolvida com os animais infectados e os riscos que essa zoonose subdiagnosticada apresenta para essa população, tornando-se uma doença relevante na saúde única. Com isso, torna-se imprescindível a utilização de métodos de diagnóstico confiável e que dê garantias de segurança ao produtor e aos trabalhadores. O objetivo desta revisão foi justamente discutir a utilização da biologia molecular e os benefícios que estes métodos trazem na detecção e identificação da espécie de *leptospira* relacionada à doença e o quanto isso é importante na cadeia de produção dos bovinos. O presente estudo foi realizado entre o mês de novembro de 2022 e fevereiro de 2023, utilizando as bases de dados da MedLine, SciELO e BVS como fonte de informações. Ao todo, foram analisados 131 artigos e, após os processos de seleção e exclusão, foram utilizados 38 artigos, provenientes de diversos países como Brasil, Itália, Uruguai, Estados Unidos, Polônia, Alemanha e Espanha. Com base na análise destes artigos, pudemos obter informações que revelam e indicam a dimensão do impacto da leptospirose na produção de bovinos. Além disso, analisando a taxa de publicações, torna-se também evidente a busca e utilização de tecnologias moleculares para entender a taxonomia das bactérias que realmente afetam a região estudada e, com isso, ter a possibilidade de criar estratégias para o controle da doença. Muito embora o método de soroaglutinação microscópica (MAT) seja ainda considerado o padrão ouro de diagnóstico pela OIE, cada vez mais determina-se o grande poder de diagnóstico preciso por meio da utilização de métodos moleculares. Assim, a presente revisão tem como intuito trazer à tona o debate sobre o crescimento da utilização de métodos moleculares como uma via cada vez mais comum no diagnóstico de leptospirose bovina, respaldado pela sua grande eficácia.

Palavras-chave: Leptospirose; Diagnóstico; Revisão.

1 INTRODUÇÃO

Segundo os dados do censo agropecuário, publicado em 2017 pelo IBGE, o Brasil possui um rebanho com mais de 170 milhões de bovinos, sendo um importante produtor e exportador de carnes para o mundo [1]. A leptospirose bovina causa problemas reprodutivos e como consequência, pode resultar em severas perdas econômicas [2]. Por se tratar de uma doença de sintomatologia leve ou até, em alguns casos, com ausência de sinais clínicos por parte dos portadores, torna-se uma enfermidade negligenciada e de difícil controle [3,4]. A leptospira, durante a infecção, possui como órgão de eleição o rim e assim, a urina torna-se o canal principal de excreção (contínua ou intermitente) das leptospiras no ambiente [5,6]. As leptospiras são bactérias que possuem mais de 300 sorovares, os quais podem ser patogênicos ou saprófitas, sendo classificados atualmente em 66 espécies genômicas [7]. O sorovar Hardjo é considerado o principal causador da leptospirose bovina, porém, os bovinos e outros mamíferos são hospedeiros suscetíveis a infecções de todos os sorovares, podendo estes desenvolver ou não a enfermidade [8].

O diagnóstico da doença pode ser realizado por microscopia de campo escuro (DFM), cultura e isolamento da bactéria, detecção de DNA por meio de métodos moleculares e métodos sorológicos como o teste de soroaglutinação microscópica (MAT), sendo este, considerado o padrão ouro pela OIE [9]. No entanto, este apresenta importantes limitações que afetam a sua acurácia, como a necessidade de detecção de anticorpos anti-Leptospira no sangue dos animais, resultando em uma sensibilidade limitada de aproximadamente 40% na primeira semana, aumentando para 60% na quarta semana após o início da apresentação dos sinais clínicos [3], não sendo o teste mais apropriado para detecção de casos agudos da doença. Além disso, o teste possui sorovares pré-determinados para diagnóstico, perdendo a eficácia em casos de infecções por sorovares não constantes na bateria de diagnósticos. Ainda, é possível ocorrência de falso positivo causado pela detecção de anticorpos residuais provenientes da vacinação [10,11]. De acordo com os vieses na utilização do teste de MAT, a utilização de métodos diagnósticos com base molecular, como PCR e PCR em Tempo Real, Truenat™ e amplificação isotérmica mediada por loop, têm sido testados para a leptospirose [12-14]. A principal vantagem dos testes moleculares para os testes sorológicos tem sido o aumento de sensibilidade e especificidade para 100% na detecção de leptospiras patogênicas, por meio de amplificação de fragmentos de DNA dos genes envolvidos na virulência e na caracterização molecular da bactéria [15,16].

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi revisar a utilização de métodos moleculares e a sua importância na detecção e identificação do agente causador da leptospirose em bovinos.

2 METODOLOGIA

Esta Revisão foi realizada no período entre junho de 2022 e fevereiro de 2023. As buscas por artigos que embasassem este estudo foram realizadas nas bases de dados da MedLine (Medical Literature Analysis and Retrieval System Online) e SciELO (Scientific Eletronic Library Online). Foram utilizados os seguintes descritores: Leptospirosis; Bovine; Diagnosis. Sendo utilizada a palavra “and” entre os descritores citados.

Os artigos selecionados e determinados elegíveis para esta revisão, foram obtidos através de pesquisas sem restringir datas de publicações. Após a pesquisa, foi realizada a análise dos artigos selecionados seguindo critérios de inclusão (disponibilidade de resumo e texto completo; relevância para o assunto) e de exclusão (estudo não condizente com o título, irrelevância para o tema; qualidade de escrita não satisfatória). Seguindo os critérios citados, os artigos selecionados foram então lidos e, se satisfatórios, introduzidos nesta revisão.

Após a busca nos bancos de dados citados utilizando os descritores, 131 artigos foram selecionados, em idiomas como português, inglês, russo, francês, espanhol, tcheco, alemão, holandês e polonês e publicados entre os anos de 1966 e 2023. Após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão foram selecionados 34 artigos para a leitura e análise do conteúdo. (Figura 1).

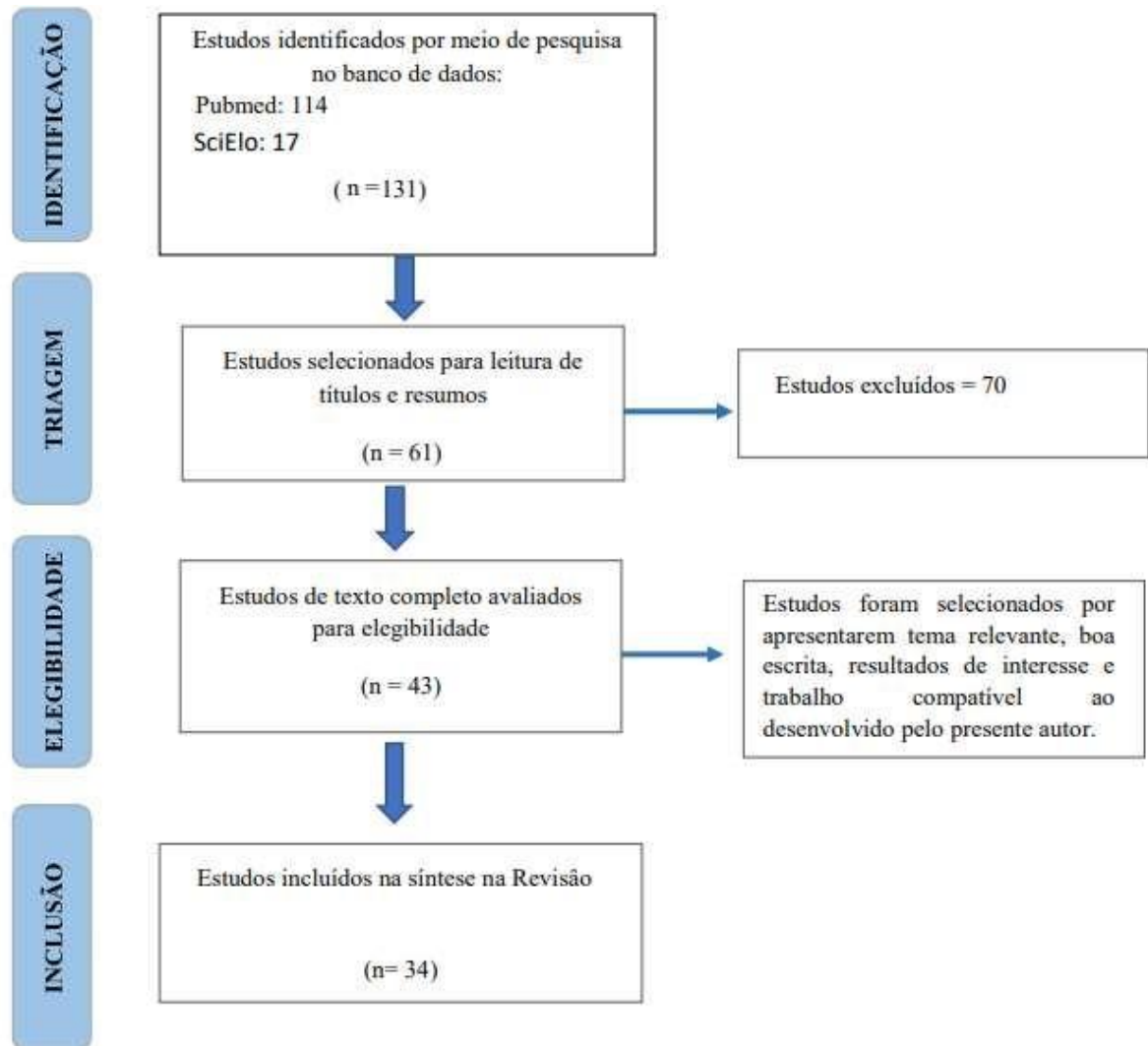


Figura 1: Fluxograma demonstrativo da realização do método de triagem utilizado para a obtenção de resultados na pesquisa de artigos para a revisão bibliográfica.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a leitura dos artigos selecionados, evidenciou-se a importância do tema de revisão, tendo em vista o quanto novos formatos de teste para o diagnóstico da enfermidade interferem nas taxas de prevalência e incidência da leptospirose nos bovinos em caráter mundial [17]. Foi possível ainda, a identificação de ferramentas moleculares que poderão vir a ser empregadas na detecção do agente, culminando em planejamentos para o uso de estratégias mais eficazes no controle da doença. [18]

O crescimento da produção bovina e a sua destacada importância econômica em países em desenvolvimento, como os da América Latina, abrange atualmente a produção de carne, leite e derivados, tanto para consumo interno quanto para exportação. [19, 20]. A ocorrência da

enfermidade de forma endêmica nos rebanhos ocasiona perdas graves, as quais podem afetar não apenas das propriedades rurais como também a economia nacional como um todo. [21, 22]. Nos estudos em que se relata a utilização de técnicas moleculares, como a PCR, esta constitui-se como uma poderosa ferramenta na detecção e na triagem de animais infectados, os quais são perpetuadores do agente na propriedade e potenciais disseminadores intermitentes da doença aos demais animais domésticos e silvestres, o que ocorre na maioria das vezes sem presença de sinais clínicos evidentes. [23]. Além disso, a PCR em tempo real também é vista como um método de detecção eficiente e, até mesmo, revolucionária no diagnóstico da enfermidade devido, principalmente, à sua velocidade de execução e aos resultados apresentados, que demonstram sensibilidade e especificidade superiores em comparação com outros testes consagrados [14]. Em adição, PCR em tempo real apresenta vantagens sobre a PCR convencional devido à redução de contaminação, a possibilidade de monitoramento da reação em tempo real e a não necessidade de processos após a reação, sendo possível a sua utilização inclusive para medir a eficácia do tratamento da doença por meio da quantificação do DNA genômico [12].

Um dos vieses envolvendo os métodos de PCR e PCR em Tempo Real, por outro lado, é a necessidade de um e equipamentos específicos para a realização da técnica com segurança. Tendo em vista esta necessidade estrutural, foi criado pela empresa indiana Molbio Diagnostics Private Limited o sistema Truenat™ micro PCR em tempo real, constituindo-se em um kit para rápida execução, o qual foi utilizado inicialmente para tuberculose, sendo estendido posteriormente para outros patógenos, como *Leptospira*. Composto por cartuchos descartáveis preenchidos por reagentes específicos para o patógeno, o formato de teste age através da extração e purificação do ácido nucleico seguida pela amplificação do gene alvo simultaneamente. Sua reação é comparada à da técnica de Real-Time PCR, porém em sistema prático e em tamanho pequeno [25] (Molbio Diagnostics Pvt. Ltd). Recentemente, um estudo foi conduzido para avaliar a performance de PCR, PCR em tempo real e o Truenat™. Esta pesquisa utilizou como alvo uma região conservada do gene que codifica para proteína LipL32, a principal proteína de membrana externa das leptospiros patogênicas, resultando em especificidade e sensibilidade superiores a 95% ao utilizar o Kit rápido, semelhante à eficácia dos outros dois métodos. Ao analisar os resultados, evidenciou-se que o Truenat™ pode ser considerado um método confiável para a detecção de leptospiros patogênicas, sem ter a necessidade de mão de obra qualificada ou grande estrutura laboratorial [13].

Além desses, pode-se evidenciar a existência de outro método, que utiliza a amplificação isotérmica mediada por Loop, o LAMP. Este método trata-se de um ensaio molecular

econômico, que tem como principal vantagem a não amplificação de DNA irrelevante durante as reações, pois amplifica apenas sequências de DNA específicas do alvo. Por necessitar basicamente de uma incubadora, torna-se um método excelente para ambientes com estrutura laboratorial limitada [14,26]. Em estudo recente, o método de LAMP foi utilizado para amplificação de LipL32 obtendo especificidade de 93,2% e sensibilidade de 84,2%. A utilização do método LAMP permitiu também a obtenção de informações importantes, como a identificação de novos genes de leptospiros patogênicas, os quais não haviam ainda sido listados na literatura [26]

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por meio de pesquisa e leitura dos artigos selecionados na revisão, com relatos e comparações, torna-se clara a vasta gama de benefícios que se obtêm ao utilizar tecnologia molecular como ferramenta para o diagnóstico da leptospirose bovina. A análise expõe também, as limitações que se encontram ao utilizar unicamente testes sorológicos na detecção de animais portadores nos rebanhos, os quais são disseminadores do agente para animais e humanos, podendo resultar em graves prejuízos econômicos e sanitários. Dessa forma, evidencia-se que métodos moleculares surgem como uma excelente alternativa para a detecção de animais portadores de leptospirose em todas as fases da cadeia produtiva, podendo ser usados em combinação com o teste de MAT para o diagnóstico de certeza da leptospirose bovina.

Conflito de interesse

Os autores declaram que não possuem conflito de interesse.

Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES e CNPq pelos auxílios financeiros para a execução deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- [1] IBGE (2017). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Retrieved from https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo_agro/resultadosagro/pecuaria.html.

- [2] Adler, B. (2015). *Leptospira* and leptospirosis. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, Berlin, 387, 293.
- [3] Pinto, P. S., Loureiro, A. P., Penna, B., & Lilenbaum, W. (2015). Usage of *Leptospira* spp. local strains as antigens increases the sensitivity of the serodiagnosis of bovine leptospirosis. *Acta Tropica*, 149, 163-167.
- [4] Ellis, W.A. (2015). Animal leptospirosis. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 387, 99-137.
- [5] Loureiro, A. P., Pestana, C., Medeiros, M. A., & Lilenbaum, W. (2017). High frequency of leptospiral vaginal carriers among slaughtered cows. *Animal Reproduction Science*, 178, 50e4.
- [6] Cavalcante, F. A. (2021) Leptospirose bovina: cuidados preventivos evitam prejuízo e garantem saúde do rebanho. <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1132497>
- [7] Caimi, K., and Paula Ruybal. "Leptospira spp., a genus in the stage of diversity and genomic data expansion." *Infection, Genetics and Evolution* 81 (2020): 104241.
- [8] Goris, Marga GA, and Rudy A. Hartskeerl. "Leptospirosis serodiagnosis by the microscopic agglutination test." *Current protocols in microbiology* 32.1 (2014): 12E-5.
- [9] Niloofa, Roshan, et al. "Diagnosis of leptospirosis: comparison between microscopic agglutination test, IgM-ELISA and IgM rapid immunochromatography test." *PloS one* 10.6 (2015): e0129236.
- [10] Ahmed, Ahmed, et al. "Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic *Leptospira* species in clinical materials." *PloS one* 4.9 (2009): e7093.
- [11] Panwala, Tanvi, Sangeeta Rajdev, and Summaiya Mulla. "To evaluate the different rapid screening tests for diagnosis of leptospirosis." *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR* 9.2 (2015): DC21.

- [12] Podgoršek, D., Ružić-Sabljic, E., Logar, M., Pavlović, A., Remec, T., Baklan, Z., Pal, E., Cerar, T., 2020. Evaluation of real-time PCR targeting the lipL32 gene for diagnosis of *Leptospira* infection. *BMC Microbiol.* 20 (59), 1–9.
- [13] Rajamani, M., Maile, A., Sugunan, A.P., Vijayachari, P., 2021. TruenatTM-micro real-time-polymerase chain reaction for rapid diagnosis of leptospirosis at minimal resource settings. *Indian J. Med. Res.* 154 (1), 115.
- [14] Linn, X., Chen, Y., Lu, Y., Yan, J., Yan, J., 2009. Application of a loop-mediated isothermal amplification method for the detection of pathogenic *Leptospira*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 63, 237–242.
- [15] Levett, P.N., Morey, R.E., Galloway, R.L., Turner, D.E., Steigerwalt, A.G., Mayer, L.W., 2005. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *J. Med. Microbiol.* 54 (Pt 1), 45–49
- [16] Stoddard, R.A., 2013. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through Real-Time PCR (qPCR) targeting the LipL32 gene. *Methods Mol. Biol.* 943, 257–266.
- [17] Di Azevedo, M. I. N., and W. Lilenbaum. "An overview on the molecular diagnosis of animal leptospirosis." *Letters in Applied Microbiology* 72.5 (2021): 496-508.
- [18] Harran, Elena, et al. "Molecular and Serological Identification of Pathogenic *Leptospira* in Local and Imported Cattle from Lebanon." *Transboundary and Emerging Diseases* 2023 (2023).
- [19] FAO (2013). *World Livestock 2013: Changing disease landscapes.* (Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome).
- [20] Dewes, C., Silva, J. P. M., Fortes, T. P., Marmitt, I. V. P., Vasconcellos, F. A., Felix, S. R., & Silva, É. F. (2020). Prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* em bovinos confinados para exportação. *Research, Society and Development*, 9, 11, e3329119929.

- [21] Loureiro, A. P., Pestana, C., Medeiros, M. A., & Lilenbaum, W. (2017). High frequency of leptospiral vaginal carriers among slaughtered cows. *Animal Reproduction Science*, 178, 50e4.
- [22] WHO. World Health Organization (2003). *Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control*. Malta.
- [23] Panwala, T., Mulla, S., Patel, P., 2011. Seroprevalence of leptospirosis in South Gujarat region by evaluating the two rapid commercial diagnostic kits against the MAT test for detection of antibodies to *Leptospira interrogans*. *Natl J. Community Med.* 2 (1), 64–70.
- [24] Demir, Yakup, and Çiğdem Mermutluoğlu. "Leptospirosis accompanying COVID-19: A case report." *Journal of Clinical Trials and Experimental Investigations* 1.2 (2022): 60-63.
- [25] Picardeau, M., Bertherat, E., Jancloes, M., Skouloudis, A.N., Durski, K., Hartskeerl, R.A., 2014. Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: current tools and emerging technologies. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 78 (1), 1–8
- [26] PACCE, Violetta. Desenvolvimento e validação de método de amplificação isotérmica para detecção de leptospirosas patogênicas. 2020. 66f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

4.2 Artigo 2

Detection of *Leptospira* spp. DNA in urine of slaughtered asymptomatic beef cattle in Southernmost Brazil

Gustavo Afra Mazza; Francieli Dell'Osbel; Kauê Rodriguez Martins; Rodrigo Casquero Cunha; Everton Fagonde da Silva

Submetido à revista Ciência Rural

Detection of *Leptospira* spp. DNA in urine of slaughtered asymptomatic beef cattle in Southernmost Brazil

Detecção de DNA de *Leptospira* spp. na urina de bovinos assintomáticos abatidos em frigoríficos no sul do Brasil.

Gustavo Afra Mazza

Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas

Instituição: Universidade Federal de Pelotas – UFPel

Endereço: Avenida Eliseu Maciel, Campus Universitário, S/N - Capão do Leão – RS, Brasil

E-mail: gugamazza@hotmail.com

Francieli Dell’Osbel

Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas

Instituição: Universidade Federal de Pelotas – UFPel

Endereço: Avenida Eliseu Maciel, Campus Universitário, S/N - Capão do Leão – RS, Brasil

E-mail: fran_dellosbel@hotmail.com

Kauê Rodriguez Martins

Pesquisador de Pós-Doutorado

Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Instituição: Universidade Federal de Pelotas – UFPel

Endereço: Avenida Eliseu Maciel, Campus Universitário, S/N - Capão do Leão – RS, Brasil

E-mail: kauerodriguez@gmail.com

Rodrigo Cunha Casquero

Docente da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas

Instituição: Universidade Federal de Pelotas – UFPel

Endereço: Avenida Eliseu Maciel, Campus Universitário, S/N - Capão do Leão – RS, Brasil E-mail: rodrigocunha_vet@hotmail.com

Éverton Fagonde da Silva

Docente da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas

Instituição: Universidade Federal de Pelotas – UFPel

Endereço: Avenida Eliseu Maciel, Campus Universitário, S/N - Capão do Leão – RS, Brasil E-mail: fagondee@gmail.com

Abstract

Background. Bovine leptospirosis is a worldwide zoonotic infectious disease, and it is considered endemic in Brazil. It is one of the most important reproductive diseases in cattle. microscopic agglutination test (MAT) is the most commonly diagnosis method for leptospirosis, but it is an inadequate test for detecting an individual bovine carrier status. In this study, the aim was to perform a urinary polymerase chain reaction (PCR) for detection of leptospiral infection in asymptomatic bovine slaughtered in Pelotas city, RS, Brasil. **Methods.** Urine samples were collected from 123 animals at the time of evisceration by direct vesical puncture and transported to the laboratory for PCR. **Results.** PCR demonstrated that 23/123 animals (18.7%) were positive on at least one of the tested targets (Lip132 and 16SRNA) and were considered *Leptospira* carriers. **Conclusion.** This work reveals important insights into a one health context that bovines slaughtered in Pelotas city may be a potential source of leptospirosis for humans, animals, and environment. Moreover, PCR in the format employed here may be used for the leptospiral DNA detection in asymptomatic beef cattle in slaughterhouses.

Keywords: leptospiral; molecular diagnosis.

INTRODUCTION

Leptospirosis is caused by pathogenic leptospires and affects animals and human. In bovine herds, leptospirosis is a cause of the decreased animal production since animals may become unapparent carriers and therefore serving as reservoirs of leptospiral infection. Moreover, it is one of the most important reproductive diseases in cattle, including abortion and stillbirth. Traditionally, bovines are maintenance hosts of strains in the Sejroe serogroup, which are associated with the clinical findings and chronic reproductive form of leptospirosis [1].

Leptospiral isolation and culture from urine and other biologicals samples are considered as standard techniques in the laboratorial diagnosis [2], but it is laborious and requires selective media, so it is not used as a routine diagnostic tool [3]. Thus, Microscopic agglutination test (MAT) is the most commonly diagnosis method performed and an acceptable serologic tool for screening of leptospirosis on a based herd, but it is an inadequate test for detecting an individual bovine carrier status [4]. In Brazil, the serological scenario of endemicity of bovine leptospirosis has been reported [5,6].

According previous studies, molecular assays, as PCR, exhibit a sensitivity and specificity between 60-100%, and may be reliably performed on a range of samples, including urine, plasma, and renal tissues [7]. In last years, PCR has been used for the detection of leptospiral DNA in clinical samples for identify leptospiral carriers in bovine livestock [8]. Considering this context, the aim of our study was to perform a urinary PCR for detection of leptospiral infection in asymptomatic bovine slaughtered in Pelotas city. Additionally, culture isolation was used to determine the occurrence of chronic carriers of *Leptospira*.

MATERIAL AND METHODS

The convenience sampling was randomly collected from 123 male animals belonging to eight cities of Southern of Rio Grande do Sul (RS) State, Brazil. The slaughterhouse located in the Pelotas (RS) was selected based in the average daily slaughter volume (>200 bovines). As inclusion criteria, bovines should be adults (>18 months) and untreated for leptospirosis.

Additionally, demographic data and animals' sanitary status were obtained from abattoir records. Individual information of each animal was not available. A pre-slaughter inspection to determine if all animals were free of clinical signs of leptospirosis was conducted by a veterinarian inspector.

At the time of evisceration, urine samples were obtained by direct vesical puncture with sterile syringe and immediately chilled and transported to the laboratory for PCR. Additionally, few drops of urine were inoculated into 5 mL of EMJH liquid medium (Difco, BD, Franklin Lakes, NJ, USA) with 5- fluorouracil (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). These tubes were maintained at room temperature and transported to the laboratory and cultures were incubated at 29 °C for up to 3 months [9]. This study was approved by animal ethics committee (CEUA) of Universidade Federal de Pelotas (0678-2017).

All genomic DNA (gDNA) were extracted from urine samples using the Brazol reagent (phenol and guanidine thiocyanate, Nova Biotecnologia, Brazil) following manufacturer's instructions. The final product was diluted in 50 µl of buffer, after that were quantified through the UV light spectrophotometer (NanoDrop®) to assess its quality with the parameters of purity and concentration, therewith, a sample amount was taken for asses its quality (degradation) through of 2.5% agarose gel electrophoresis. Once it was confirmed without degradation, these were stored at -80 °C. Both amplicons were amplified using the following mixture: 5 µl of sample buffer, 5 µl of MgCl₂(50 mM), 4 µl of dNTP mix (2.5 mM), 0,5 µl of each primer forward and reverse (25 pmol), 0.5 µl of Taq DNA Polimerase (5U/µl), and DNase and RNase free water,

and 2,5 µl (100 ng/µl) of gDNA in a total volume of 50 µl. The lipL32 gene was amplified with primers (lipL32F 5'-ATCTCCGTTGCACTCTTTGC-3' and lipL32R 5'-ACCATCATCATCATCGTCCA-3') which generate a fragment of 472 bp. One cycle of initial denaturation at 94 °C for three minutes, followed by 35 cycles of denaturation at 94 °C for 30 seconds, annealing the primers to 58 °C for 30 seconds and extension with 72 °C for 60 seconds and final extension cycle at 72 °C for seven minutes [10]. Also, primers targeting the 16SRNA gene were used (16SRF 5'- GGCGGC GCGTCTTAAACATG-3' and 16SRR 5'-TTCCCCCATTGAGCAAGATT-3') which generate a fragment of 331 bp [11]. One cycle of initial denaturation at 94 °C for three minutes, followed by 35 cycles of denaturation at 94 °C for 1 minute, annealing the primers to 63 °C for 90 seconds and extension with 72 °C for two minute followed by a final extension cycle at 72 °C for ten minutes [3]. To visualize the fragments, the amplified products were submitted to U.V. light in a transilluminator.

RESULTS

PCR demonstrated that 23/123 animals (18.7%) were positive at least one of the tested targets (LipL32 and 16SRNA) and were considered *Leptospira* carriers. In other hand, leptospiral DNA was detected in urine by PCR, but none isolate was obtained in our study after 3 months.

DISCUSSION

Our study describes an expressive number of carriers among cattle in Southern of Rio Grande do Sul state, despite studies in abattoirs constitute a restricted population and geographic area. Our results were in accordance with a previous study with cattle in Brazil which detected leptospiral DNA in 21.6% of urine samples from bovines in Rio de Janeiro state [12]. However, urine samples were obtained from animals without clinically apparent leptospirosis or from herds with a historic of reproductive problems.

The control measures to bovine leptospirosis should not be based only on the serological diagnosis of the herd, due serology is not adequate for the individual detections of carriers, but mainly on the use of rapid tests for the detection of animals that are spreading leptospires to the environment. Isolation and culture of leptospires is laborious, low sensitivity, and timeconsuming. In other hand, PCR has been demonstrated to be a useful tool for the diagnosis of leptospirosis [13], due it is rapid and may be included in bovine leptospirosis diagnosis. For the success of the leptospirosis control programs in rural properties, in comparison to the serological methods, as MAT, PCR is a useful tool related to the detection of shedding animals. Molecular tests can be routinely used during the acute leptospirosis phase since this early detection of leptospirosis is essential for the initiation of prompt antibiotic treatment [4]. PCRbased assays have been developed and are commercially available for the diagnosis of leptospiral infections. However, most of these test's formats are not widely available and needs laboratory quality control, which implies in its difficult implementation in several laboratories [2].

LipL32 is found in pathogenic leptospires and is highly conserved and immunogenic, but it is not found in saprophytic species. For this reason, LipL32 is a potential diagnostic reagent in both serological and molecular assays [14]. Interestingly, in our results, of the 23 animals detected as carriers of leptospiral DNA, all amplified the 16SRNA gene but 20 (16.3%) of them also amplified the LipL32 gene. Thus, according to the results obtained in our study, we hypothesized that 3 (2.43%) animals could be carrying DNA from saprophyte leptospires. However, the presence of inhibitors or technical failure cannot be discarded and may be related to the any level of discrepancy between PCR-positive or negative.

Bovine leptospirosis is endemic in Brazil [5], and this can also be transmitted through direct contact or consumption of contaminated food and water. In addition, leptospirosis affects preferentially some exposed occupational activities as farmers, animal raisers, veterinarians,

and slaughterhouse workers [15]. In this context, we have demonstrated in our study that PCR in the format employed here may be used for the leptospiral DNA detection in asymptomatic beef cattle in slaughterhouse.

Acknowledgements

This study was supported by Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel of Ministry of Education (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Brazil.

References

- [1] ADLER B., de la PEÑA MOCTEZUMA A. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol*, 2010.
- [2] PINTO, G. V., SENTHILKUMAR, K., Rai, P., KABEKKODU, S. P., KARUNASAGAR, I., & KUMAR, B. K. (2022). Current methods for the diagnosis of leptospirosis: Issues and challenges. *Journal of Microbiological Methods*, 195, 106438.
- [3] ZARANTONELLI, L.; SUANE, A.; MENY, P.; BURONI, F.; NIEVES, C.; SALABERRY, X. (2018) Isolation of pathogenic *Leptospira* strains from naturally infected cattle in Uruguay reveals high serovar diversity, and uncovers a relevant risk for human leptospirosis. *PLoS Negl Trop Dis* 12(9):
- [4] ELLIS, W. A. Animal leptospirosis. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2015.
- [5] FÁVERO, J. F., DE ARAÚJO, H. L., LILENBAUM, W., MACHADO, G., TONIN, A. A., BALDISSERA, M. D., ... & DA SILVA, A. S. (2017). Bovine leptospirosis: Prevalence, associated risk factors for infection and their cause-effect relation. *Microbial pathogenesis*, 107, 149-154.
- [6] HIGINO, S. S., SANTOS, F. A., COSTA, D. F., SANTOS, C. S., SILVA, M. L., ALVES, C. J., & AZEVEDO, S. S. (2013). Flock-level risk factors associated with leptospirosis in dairy goats in a semiarid region of Northeastern Brazil. *Preventive Veterinary Medicine*, 109(1-2), 158-161.

- [7] GRAVENKAMP, C., VAN DE KEMP, H., FRANZEN, M., CARRINGTON, D., SCHOONE, G. J., VAN EYS, G. J. J. M., ... & TERPSTRA, W. J. (1993). Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. *Microbiology*, 139(8), 1691-1700.

- [8] PINNA, M. H., MARTINS, G., LOUREIRO, A. P., & LILENBAUM, W. (2018). Detection of bovine carriers of *Leptospira* by serological, bacteriological, and molecular tools. *Tropical animal health and production*, 50, 883-888.

- [9] KLAASEN, H. L., & ADLER, B. (2015). Recent advances in canine leptospirosis: focus on vaccine development. *Veterinary Medicine: Research and Reports*, 245-260.

- [10] STODDARD, R. A.; ROBYN, J. E.; GEE, J. E.; WILKINS, P. P.; MCCAUSTLAND, K.; HOFFMASTER, A. R. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, Volume 64, Issue 3, 2009, Pages 247-255.

- [11] MERIEN, F., AMOURIAX, P., PEROLAT, P., BARANTON, G., & SAINT GIRONS, I. (1992). Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *Journal of clinical microbiology*, 30(9), 2219-2224.

- [12] HAMOND, C., MARTINS, G., LOUREIRO, A. P., PESTANA, C., LAWSON-FERREIRA, R., MEDEIROS, M. A., & LILENBAUM, W. (2014). Urinary PCR as an increasingly useful tool for an accurate diagnosis of leptospirosis in livestock. *Veterinary research communications*, 38, 81-85.

- [13] MENY, P., HERNANDEZ, E., SCHELOTTO, F., & VARELA, G. (2014). Valoración de un procedimiento de inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos tipo IgM (IF-IgM) utilizado en el diagnóstico temprano de leptospirosis. *Revista Médica del Uruguay*, 30(2), 88-92.

- [14] MURRAY, G. L., SRIKRAM, A., HOKE, D. E., WUNDER Jr, E. A., HENRY, R., LO, M., ... & ADLOR, B. (2009). Major surface protein LipL32 is not required for either acute or chronic infection with *Leptospira interrogans*. *Infection and immunity*, 77(3), 952-958.

- [15] PICARDEAU, M. (2013). Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Médecine et maladies infectieuses*, 43(1), 1-9.

5 Considerações Finais

A partir do Artigo 1, evidenciamos uma série de vantagens na utilização de testes moleculares no diagnóstico de leptospirose. Estudos ressaltam o quanto a sensibilidade e a especificidade podem chegar a 100% nos casos em que há comparação entre os diferentes métodos sorológicos e moleculares, e assim, aumentar a acurácia do diagnóstico da leptospirose.

No estudo apresentado no Artigo 2, a PCR no formato utilizado detectou DNA leptospiral em 18.3% das amostras de urina. A partir desse resultado, esse estudo demonstra a capacidade da bactéria em infectar túbulos renais, tornando os animais infectados, mesmo que assintomáticos, potenciais disseminadores da bactéria.

Assim, de acordo com o exposto, podemos afirmar que métodos moleculares são ferramentas que auxiliam no diagnóstico assertivo de leptospirose, elevando a especificidade e sensibilidade obtidas em comparação a testes comumente utilizados.

Referências

ADLER, B. & DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3-4, p. 287–296, 2010.

ADLER, B. *Leptospira* and leptospirosis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 387, p. 293, 2015.

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

AHMED, A.; ENGELBERTS, M. F.; 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, e7093, 2009.

BANDEIRA, D. A.; HERRMANN, G. P.; MOREIRA, E. C.; PRADO, P. E. F.; LOBATO, Z. I. P.; DE BRITO, C. P. T.; LAGE, A. P. Spatial hierarchical variances and age covariances for seroprevalence to *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*, BoHV-1 and BVDV for cattle in the State of Paraíba, Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 76, n. 3–4, p. 290-301, 2006.

BATISTA, C. D. S. A.; ALVES, C. J.; AZEVEDO S. S. D.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS Z. M. D.; CLEMENTINO, I. J.; ARAUJO, N. J. O. Soroprevalência e fatores de risco para a leptospirose em cães de Campina Grande, Paraíba. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 2, p. 179-185, 2005.

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

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

BRASIL, 2005. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 6ª ed. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasília, p.502-520.

CAIMI, K. & RUYBAL, P. *Leptospira* spp., a genus in the stage of diversity and genomic data expansion. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 81, 104241, 2020.

CAVALCANTE, F. A. **Leptospirose bovina: cuidados preventivos evitam prejuízo e garantem saúde do rebanho**. 2021. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1132497>. Acesso em: 13 nov. 2022.

CERVANTES, L. P. M.; PUEBLA, M. A. C.; ROSAS, D. G.; SERRANIA, N. R.; BARRANCA, J. I. T. Estudio serológico de leptospirosis bovina en México. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 54, n. 1, p. 24-27, 2002.

DE BRITO, T.; SILVA, A.; ABREU, P. A. E. Pathology and pathogenesis of human leptospirosis: a commented review. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 60, e23, 2018.

DEMIR, Y. & ÇİĞDEM M. Leptospirosis accompanying COVID-19: A case report. **Journal of Clinical Trials and Experimental Investigations**, v. 1, n. 2, p. 60-63, 2022.

DEWES, C.; SILVA, J. P. M.; FORTES, T. P.; MARMITT, I. V. P.; VASCONCELLOS, F. A.; FELIX, S. R.; SILVA, É. F. Prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* em bovinos confinados para exportação. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 11, e3329119929, 2020.

DI AZEVEDO, M. I. N. & LILENBAUM W. An overview on the molecular diagnosis of animal leptospirosis. **Letters in Applied Microbiology**, v. 72, n. 5, p. 496-508, 2021.

DREYFUS, A.; RUF, M. T.; MAYER-SCHOLL, A.; ZITZL, T.; LOOSLI, N.; BIER, N. S.; HIERETH, S.; ULRICH, S.; POPPERT, S.; STRAUBINGER, R. K.; STENOS, J.; TSHOKEY, T. Exposure to *Leptospira* spp. and associated risk factors in the human, cattle and dog populations in Bhutan. **Pathogens**, v. 10, n. 3, 2021.

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

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **World Livestock 2013: Changing disease landscapes**. (Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome). 2013, 130p. Disponível em: <https://www.fao.org/4/i3440e/i3440e.pdf>. Acesso em: 21 set. 2022.

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

FAVERO, M.; PINHEIRO, S. R.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z. M.; FERREIRA, F. Leptospirose bovina: variantes sorológicas predominantes em colheitas efetuadas no período de 1984 a 1997 em rebanhos de 21 estados do **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 68, n. 2, p. 29-35, 2001.

GORIS, M. G. A. & RUDY A. H. Leptospirosis serodiagnosis by the microscopic agglutination test. **Current Protocols in Microbiology**, v. 32, n. 1, 12E-5, 2014.

GRAVENKAMP, C.; VAN DE KEMP, H.; FRANZEN, M.; CARRINGTON, D.; SCHOONE, G. J.; VAN EYS, G. J. J. M.; TERPSTRA, W. J. Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. **Microbiology**, v. 139, n. 8, p. 1691-1700, 1993.

GRESSLER, M. A.; SCHEID, R.; MARTINS, D.; FANFA, L.; KRUG, S. B. F. Leptospirose e exposição ocupacional: um estudo no município de Santa Cruz do Sul/RS. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 2, n. 2, p. 51-54, 2012.

HAAKE, D. A.; CHAO, G. ZUERNER, R. L.; BARNETT, D.; MAZEL, M.; MATSUNAGA, J.; LEVETT, P. N.; BOLIN, C. A. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 4, p. 2276-2285, 2000.

HAMOND, C.; MARTINS, G.; LOUREIRO, A. P.; PESTANA, C.; LAWSON-FERREIRA, R.; MEDEIROS, M. A.; LILENBAUM, W. Urinary PCR as an increasingly useful tool for an accurate diagnosis of leptospirosis in livestock. **Veterinary Research Communications**, v. 38, p. 81-85, 2014.

HARRAN, E.; ABI RIZK, A.; ANGELLOZ-PESSEY, S.; GROUD, K.; LATTARD, V.; HILAN, C.; AYRAL, F. Molecular and serological identification of pathogenic leptospira in local and imported cattle from Lebanon. *Transboundary and Emerging Diseases*, 3784416, 2023.

HIGINO, S. S.; SANTOS, F. A.; COSTA, D. F.; SANTOS, C. S.; SILVA, M. L.; ALVES, C. J.; AZEVEDO, S. S. Flock-level risk factors associated with leptospirosis in dairy goats in a semiarid region of Northeastern Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 109, n. 1-2, p. 158-161, 2013.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2017. Disponível em: https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo_agro/resultadosagro/pecuaria.html. Acesso em: 16 nov. 2022.

JAMAS, L. T.; BARCELLOS, R. R.; MENOZZI, B. D.; LANGONI, H. Leptospirose Bovina. **Veterinária e Zootecnia**, v. 27, p. 1-19, 2020.

KARPAGAM, K. B. & GANESH, B. Leptospirosis: a neglected tropical zoonotic infection of public health importance-an updated review. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 39, n. 5, p. 835-846, 2020.

KLAASEN, H. L. & ADLER, B. Recent advances in canine leptospirosis: focus on vaccine development. **Veterinary Medicine: Research and Reports**, v. 6, p. 245-260, 2015.

LAGE, A. P.; LEITE, R. M. H.; THOMPSON, J. A.; BANDEIRA, D. A.; HERMANN, G. P.; MOREIRA, E. C.; GONÇALVES, V. S. P. Serology for *Leptospira* sp. in cattle of the State of Paraíba, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 74, n. 3, 185190, 2007.

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

LILENBAUM, W. & SOUZA, G. N. Factors associated with bovine leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 75, n. 3, p. 249-251, 2003.

LINN, X.; CHEN, Y.; LU, Y.; YAN, J.; YAN, J. Application of a loop-mediated isothermal amplification method for the detection of pathogenic *Leptospira*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 63, n. 3, p. 237–242, 2009.

LOUREIRO, A. P.; PESTANA, C.; MEDEIROS, M. A.; LILENBAUM, W. High frequency of leptospiral vaginal carriers among slaughtered cows. **Animal Reproduction Science**, v. 178, p. 50-54, 2017.

MACHADO, G. B.; SEIXAS NETO, A. C. P.; FORTES, T. P.; DEWES, C.; BORSUK, S.; VASCONCELLOS, F. A.; FELIX, S. R.; SILVA, É. F. D. Prevalence and risk factors for human leptospirosis in a rural district of Pelotas, a city in southernmost Brazil. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 10, e6429108903, 2020.

MENY, P.; HERNANDEZ, E.; SCHELOTTO, F.; VARELA, G. Valoración de un procedimiento de inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos tipo IgM (IF-IgM) utilizado en el diagnóstico temprano de leptospirosis. **Revista Médica del Uruguay**, v. 30, n. 2, p. 88-92, 2014.

MERIEN, F.; AMOURIAX, P.; PEROLAT, P.; BARANTON, G.; SAINT GIRONS, I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 9, p. 2219-2224, 1992.

MILLER, D. A.; WILSON, M. A.; BERAN, G. W. Survey to estimate prevalence of *Leptospira interrogans* infection in mature cattle in the United States. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, n. 11, p. 1761-1765, 1991.

MURRAY, G. L.; SRIKRAM, A.; HOKE, D. E.; WUNDER Jr, E. A.; HENRY, R.; LO, M.; ADLOR, B. Major surface protein LipL32 is not required for either acute or chronic infection with *Leptospira interrogans*. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 3, p. 952-958, 2009.

NALLY, J. E.; HORNSBY, R. L.; ALT, D. P.; BAYLES, D.; WILSON-WELDER, J. H.; PALMQUIST, D. E.; BAUER, N. E. Isolation and characterization of pathogenic leptospires associated with cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 218, p. 25-30, 2018.

NILOOFA, R.; FERNANDO, N.; DE SILVA, N. L.; KARUNANAYAKE, L.; WICKRAMASINGHE, H.; DIKMADUGODA, N.; PREMAWANSA, G.; WICKRAMASINGHE, R.; DE SILVA, H. J.; PREMAWANSA, S.; RAJAPAKSE, S.; HANDUNNETTI, S. Diagnosis of leptospirosis: comparison between microscopic agglutination test, IgM-ELISA and IgM rapid immunochromatography test. **PloS one**, v. 10, n. 6, e0129236, 2015.

NOLTE, F. S. & CALIENDO, A. M. **Molecular detection and identification of microorganisms**. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. (Eds), Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. ASM Press, Washington, 2003, p.234-256.

OIE - World Organization for Animal Health. **Leptospirosis**. (ed.). Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees). 24.ed. Paris: World Organization for Animal Health, 2021, p.1-10.

PACCE, Violetta. **Desenvolvimento e validação de método de amplificação isotérmica para detecção de leptospiras patogênicas**. 2020. 66f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

PANWALA, T.; MULLA, S.; PATEL, P. Seroprevalence of leptospirosis in South Gujarat region by evaluating the two rapid commercial diagnostic kits against the MAT test for detection of antibodies to *Leptospira interrogans*. **National Journal of Community Medicine**, v. 2, n. 1, p. 64–70, 2011.

PANWALA, T.; RAJDEV, S.; MULLA, S. To evaluate the different rapid screening tests for diagnosis of leptospirosis. **Journal of clinical and diagnostic research: JCDDR**, v. 9, n. 2, DC21–DC24, 2015.

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

PICARDEAU, M.; BERTHERAT, E.; JANCLOES, M.; SKOULLOUDIS, A. N.; DURSKEI, K.; HARTSKEERL, R. A. Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: current tools and emerging technologies. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 78, n. 1, p. 1–8, 2014.

PINNA, M. H.; MARTINS, G.; LOUREIRO, A. P.; LILENBAUM, W. Detection of bovine carriers of *Leptospira* by serological, bacteriological, and molecular tools. **Tropical Animal Health and Production**, v. 50, p. 883-888, 2018.

PINTO, G. V.; SENTHILKUMAR, K.; Rai, P.; KABEKKODU, S. P.; KARUNASAGAR, I.; KUMAR, B. K. Current methods for the diagnosis of leptospirosis: Issues and challenges. **Journal of Microbiological Methods**, v. 195, 106438, 2022.

PINTO, P. S.; LOUREIRO, A. P.; PENNA, B.; LILENBAUM, W. Usage of *Leptospira* spp. local strains as antigens increases the sensitivity of the serodiagnosis of bovine leptospirosis. **Acta Tropica**, v. 149, p. 163-167, 2015.

PODGORŠEK, D.; RUŽIĆ-SABLJIĆ, E.; LOGAR, M.; PAVLOVIĆ, A.; REMEC, T.; BAKLAN, Z.; PAL, E.; CERAR, T. Evaluation of real-time PCR targeting the lipL32 gene for diagnosis of *Leptospira* infection. **BMC Microbiology**, v. 20, n. 59, p. 1–9, 2020.

RAJAMANI, M.; MAILE, A.; SUGUNAN, A. P.; VIJAYACHARI, P. Truenat™-micro real-time-polymerase chain reaction for rapid diagnosis of leptospirosis at minimal resource settings. *Indian Journal of Medical Research*, v. 154, n. 1, p. 115, 2021.

RAJEEV, S.; ILHA, M.; WOLDEMESKEL, M.; BERGHAUS, R. D.; PENCE, M. E. Detection of asymptomatic renal *Leptospira* infection in abattoir slaughtered cattle in southeastern Georgia, United States. **SAGE Open Medicine**, v. 2, 2050312114544696, 2014.

ROY, S. B.; BISWAS, D.; VIJAYACHARI, A. P.; SUGUNAN, A. P.; SEHGAL, S. C. A clone of *Leptospira interrogans* sensu stricto is the major cause of leptospirosis in the archipelago of Andaman and Nicobar Islands, India. **Letters in Applied Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 179–185, 2005.

SANTOS, Balbino Lino dos. **Avaliação de testes sorológicos para o diagnóstico da leptospirose na fase aguda**. 2006. 76 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2006.

STODDARD, R. A.; ROBYN, J. E.; GEE, J. E.; WILKINS, P. P.; MCCAUSTLAND, K.; HOFFMASTER, A. R. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene, **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 64, n. 3, p. 247-255, 2009.

STODDARD, R. A. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through Real-Time PCR (qPCR) targeting the LipL32 gene. **Methods in Molecular Biology**, v. 943, p. 257–266, 2013.

THIBEAUX, R.; IRAOLA, G.; FERRES, I.; BIERQUE, E.; GIRAULT, D.; SOUPEGILBERT, M. E.; PICARDEAU, M.; GOARANT, C. Deciphering the unexplored *Leptospira* diversity from soils uncovers genomic evolution to virulence. **Microbial Genomics**, v. 4, n. 1, 2018.

THOMPSON, J. A.; LEITE, R. M. H.; GONÇALVES, V. S. P.; LEITE, R. C.; BANDEIRA, D. A.; HERRMANN, G. P.; MOREIRA, E. C.; PRADO, P. E. F.; LOBATO, Z. I. P.; DE BRITO, C. P. T.; LAGE, A. P. Spatial hierarchical variances and age covariances for seroprevalence to *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*, BoHV-1 and BVDV for cattle in the State of Paraíba, Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 76, n. 3–4, p. 290-301, 2006.

WHO - World Health Organization. **Guidelines for the control of leptospirosis**. Geneva: World Health Organization, 1982. 171p.

WHO. World Health Organization. **Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control**. Malta. 2003. 109p.

ZARANTONELLI, L.; SUANE, A.; MENY, P.; BURONI, F.; NIEVES, C.; SALABERRY, X. Isolation of pathogenic *Leptospira* strains from naturally infected cattle in Uruguay reveals high serovar diversity, and uncovers a relevant risk for human leptospirosis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 9, e0006694, 2018.