



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**RELATÓRIO DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO (ESO),
REALIZADO NO LABORATÓRIO DE BACTERIOLOGIA VETERINÁRIA (LaBV)
NA UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE, MUNICÍPIO DE NITERÓI,
BRASIL**

**DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*Leptospira* spp. EM ASININOS (*Equus asinus*)
DO ESTADO DE PERNAMBUCO - BRASIL.**

GUSTAVO DE OLIVEIRA ALVES PINTO

RECIFE, 2024



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

**DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*Leptospira* spp. EM ASININOS (*Equus asinus*)
DO ESTADO DE PERNAMBUCO - BRASIL.**

GUSTAVO DE OLIVEIRA ALVES PINTO

**Relatório de Estágio Supervisionado
Obrigatório realizado como exigência
para a obtenção do grau de Bacharel
em Medicina Veterinária, sob
Orientação da Profa. Dr^a. Erika
Fernanda Torres Samico-Fernandes**

RECIFE, 2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

G982d

Pinto, Gustavo de Oliveira Alves
DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-Leptospira spp. EM ASININOS (Equus asinus) DO ESTADO DE
PERNAMBUCO - BRASIL. / Gustavo de Oliveira Alves Pinto. - 2024.
43 f. : il.

Orientador: Erika Fernanda Torres Samico Samico-Fernandes.
Inclui referências.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bacharelado em
Medicina Veterinária, Recife, 2024.

1. Jumentos. 2. Leptospirose. 3. Soroaglutinação Microscópica. 4. Triagem. I. Samico-Fernandes, Erika Fernanda
Torres Samico, orient. II. Título

CDD 636.089

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer a Deus por ter me dado saúde e sabedoria para conduzir esse curso. Agradeço aos meus pais, Ana Dalva e Ronald, e ao meu irmão, Rafael, por todo o apoio durante esse processo, sem vocês eu não conseguiria chegar até aqui, amo vocês mais que tudo. Quero agradecer ao Tomás, por estar ao meu lado desde o início dessa jornada, me acompanhando em momentos bons e ruins, sem nunca soltar a minha mão.

Agradeço também aos meus amigos inseparáveis, que estão juntos a mim desde sempre, Gabi, Zé e Ivina, vocês tornaram meus dias dentro da universidade mais leves e felizes, saibam que eu os considero família. Agradeço também ao meu amigo, quase um irmão, Igor Gouveia, você foi um presente que eu quero levar para sempre comigo.

À minha amiga Dr^a Amanda Bispo, obrigado por ter me ensinado muito durante toda essa jornada, não apenas em relação a academia, mas também pelos conselhos para vida. À Dr^a Lúcia Arruda, você me despertou o interesse e o amor pela ciência, quero um dia ser um grande profissional como você, obrigado por toda a ajuda.

A aqueles que têm o dom de ensinar, a base de tudo, agradeço aos meus queridos professores, que me orientaram durante esse longo processo da graduação. Em especial à professora Érika Samico, obrigado por tudo professora, você me cativou com suas aulas e sua paixão em ensinar, tenho muito orgulho de poder contar com a senhora como orientadora do ESO. À minha banca avaliadora, Professor Gustavo Ferrer e Professora Renata Pimentel, obrigado por terem aceitado meu convite e contribuído com esse trabalho. Agradeço também à Professora Maria Madalena Guerra, à Professora Daniela Bastos, ao Professor Gilcifran de Andrade e ao Professor Rinaldo Mota.

Quero agradecer à equipe do Laboratório de Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal Fluminense, que me acolheram nesse momento de estágio supervisionado, em especial ao Professor Walter Lilenbaum, à Professora Isabel Di Azevedo e à Karina Palhares, que tanto me ajudou. Também agradeço à Eduarda Faria, sua companhia nesse momento foi essencial para eu conseguir seguir em frente, espero que continuemos trabalhando juntos por muito tempo.

Agradeço também a toda equipe do Laboratório de Doenças Infecciosas da UFRPE, e a equipe do ANDROLAB pelos ensinamentos e por todo o acolhimento. Por fim, agradeço a todos aqueles que, de alguma forma, me ajudaram, seja com um conselho ou uma piada. Todos vocês fazem parte do médico veterinário que irei me tornar.

A todos vocês meu muito obrigado!

EPÍGRAFE

“É depois da tempestade que as flores desabroçam”

Kali Uchis, 2018

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Sala de sorologia do Laboratório de Bacteriologia Veterinária, em destaque o microscópio de campo escuro e a capela de fluxo laminar. | 11 |
| Figura 2. Sala de extração de DNA do Laboratório de Bacteriologia Veterinária..... | 11 |
| Figura 3. Sala de Biologia Molecular do Laboratório de Bacteriologia Veterinária..... | 12 |
| Figura 4. Avaliação de cultura de <i>Leptospira</i> spp. apresentando uma grande quantidade de bactérias e ausência de contaminantes..... | 15 |
| Figura 5. Manipulação de culturas em capela de proteção biológica com fluxo de ar laminar | 16 |
| Figura 6. Rack para o armazenamento de <i>Leptospira</i> spp. em nitrogênio líquido (-196°C) ... | 16 |
| Figura 7. Desenho esquemático das etapas realizadas para a Soroaglutinação Microscópica | 17 |
| Figura 8. Materiais necessários para realização da Soroaglutinação Microscópica (SAM). .. | 18 |
| Figura 9. Placa de poços preparada para depósito das amostras para a realização da Soroaglutinação Microscópica. | 18 |
| Figura 10. Etapas para a realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para o diagnóstico de leptospirose..... | 20 |
| Figura 11. Revelação do gene <i>SecY – outer</i> em gel de agarose a 1,5%. | 21 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Espécies animais avaliadas pela Técnica de Soroaglutinação Microscópica durante o período do Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO). | 13 |
| Tabela 2. Atividades desenvolvidas e/ou acompanhadas durante o período do Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) | 13 |
| Tabela 3. Componentes do coquetel Staff utilizado para cultivo de <i>Leptospira</i> spp. | 14 |
| Tabela 4. Reagentes para o preparo do mix da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com enfoque no gene LipL32 para detecção do DNA de espécies patogênicas de <i>Leptospira</i> | 20 |
| Tabela 5. Etapas realizadas para amplificação do gene LipL32 de espécies patogênicas de <i>Leptospira</i> | 21 |
| Tabela 6. Reagentes para o preparo do mix da NestedPCR com enfoque no gene SecY-outer e SecY-inner | 22 |
| Tabela 7. Etapas realizadas para amplificação com os primers SecY-outer | 22 |
| Tabela 8. Etapas realizadas para amplificação com os primers SecY-inner | 23 |

RESUMO

Objetivou-se com esse trabalho descrever as atividades realizadas no estágio supervisionado obrigatório (ESO), realizado no Laboratório de Bacteriologia Veterinária (LaBV) de Universidade Federal Fluminense (UFF). O estágio foi realizado no Instituto Biomédico da UFF, localizado na rua Alameda Barros Terra, em São Domingos, Niterói-RJ, sob a supervisão do Prof. Dr. Walter Lilenbaum e Orientação da Profa. Dr^a Erika Fernanda Torres Samico-Fernades, durante o período de 02/10/2023 a 22/12/2023. Foi possível acompanhar a rotina de atividades do LaBV, realizando atividades voltadas à pesquisa sobre a Leptospirose, executando exames sorológico de rotina, pela Técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM), e pesquisa por meio de biologia molecular, pela técnica de Reação da Cadeira da Polimerase (PCR), além disso, foi possível acompanhar como é realizado a cultura e a manutenção das amostras contendo *Leptospiras* spp. vivas. Ademais, foi possível acompanhar as atividades de pesquisa realizadas no laboratório, o que proporcionou a confecção de um artigo científico cujo objetivo foi o de detectar a presença de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em amostras de asininos provenientes de duas propriedades do estado de Pernambuco, Brasil, onde o sorogrupo Australis foi o mais detectado.

Palavras-chaves: Jumentos; Leptospirose; Soroaglutinação Microscópica; Triagem

ABSTRACT

The objective of this work was to describe the activities carried out during the mandatory supervised internship, conducted at the Veterinary Bacteriology Laboratory (LaBV) of the Federal Fluminense University (UFF). The internship took place at the Biomedical Institute of UFF, located on Alameda Barros Terra Street, in São Domingos, Niterói-RJ, under the supervision of Prof. Dr. Walter Lilenbaum and guidance from Prof. Dr. Erika Fernanda Torres Samico-Fernandes, during the period from 10/2/2023, to 12/22/2023. It was possible to observe the routine activities of LaBV, conducting research on Leptospirosis, performing routine serological tests using the Microscopic Agglutination Test (MAT) technique, and molecular biology research using the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. Additionally, I had the opportunity to observe the culture and maintenance of samples containing live *Leptospira* spp. Additionally, it was possible to participate in the research activities conducted in the laboratory, leading to the preparation of a scientific article aimed at detecting the presence of anti-*Leptospira* spp. antibodies in samples from donkeys originating from two properties in the state of Pernambuco, Brazil, where the Australis serogroup was the most commonly detected.

Keywords: Donkeys; Leptospirosis; Microscopic Agglutination Test, Triage

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| CAPÍTULO I | 10 |
| 1.1. Introdução sobre o ESO | 10 |
| 1.2. Descrição do local do estágio | 10 |
| 1.3. Descrição das atividades | 12 |
| 1.3.1. Produção de Meios de Cultivo | 13 |
| 1.3.2. Manutenção de culturas de <i>Leptospira</i> | 14 |
| 1.3.3. Soroaglutinação Microscópica (SAM) | 16 |
| 1.3.4. Sorogrupagem de culturas de <i>Leptospira spp.</i> | 19 |
| 1.3.5. Diagnóstico Molecular da infecção por <i>Leptospira spp.</i> | 19 |
| 1.3.6. Identificação da Espécie | 21 |
| 1.4. Discussão das atividades desenvolvidas | 23 |
| CAPÍTULO II | 26 |
| 2.1. Resumo | 26 |
| 2.2. Introdução | 28 |
| 2.3. Revisão de Literatura | 29 |
| 2.4. Material e métodos | 31 |
| 2.5. Resultados | 32 |
| 2.6. Discussão | 33 |
| 2.7. Conclusão | 35 |
| Considerações Finais | 35 |
| Referências | 36 |

CAPÍTULO I

1.1. Introdução sobre o ESO

A realização do Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) permite ao aluno de Medicina Veterinária aprimorar experiências em áreas de interesse, contribuindo, dessa forma, com a formação do profissional, dando a oportunidade de aprendizado e aprofundamento do conhecimento. O ESO consiste em uma carga horária de 420 horas, sendo necessário realizá-lo para obter o título de bacharel em Medicina Veterinária.

O estágio foi realizado no período de 02/10/2023 a 22/12/2023, totalizando 420 horas. As atividades foram desenvolvidas no Laboratório de Bacteriologia Veterinária (LaBV), na Universidade Federal Fluminense (UFF), localizado na rua Alameda Barros Terra, nº 57, sala 719, em São Domingos, Niterói, no estado do Rio de Janeiro. O ESO foi orientado pela Professora Doutora Erika Fernanda Torres Samico-Fernandes sob supervisão do Professor Doutor Walter Lilenbaum.

Dessa forma, objetivou-se acompanhar a rotina prática do LaBV, focando nas técnicas laboratoriais e nos estudos com *Leptospira* spp., desde a manutenção de culturas vivas da bactéria à purificação de DNA para o sequenciamento genético e posterior caracterização filogenética.

1.2. Descrição do local do estágio

O ESO foi realizado nas dependências do LaBV, localizado no Instituto Biomédico do Campus Valonguinhos da UFF. O laboratório é coordenado pelo Prof. Dr. Walter Lilenbaum. A equipe conta com três pós-doutorandos, nove alunos de pós-graduação e cinco discentes de iniciação científica.

O LaBV é dividido em quatro áreas, com uma sala exclusivamente destinada ao cultivo e às análises sorológicas, pelo método de Soroaglutinação Microscópica (SAM), utilizando um microscópio de campo escuro, e para a manutenção das culturas vivas de *Leptospira* spp. Outra sala destinada apenas à extração de DNA de amostras clínicas ou de pesquisa. Há também uma sala destinada à realização das análises moleculares, pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e para a purificação do DNA e, por fim, a área das salas de estudo.

Estruturalmente, a sala de sorologia (Figura 1) dispõe de uma balança de precisão (Marte AD200), um microscópio de campo escuro (ZEISS AX10 Imager. A2), uma cabine de

segurança biológica (Pachane® Pa400), uma estufa B.O.D à 29°C e uma incubadora com agitação orbital (QUIMIS®).

Figura 1. Sala de sorologia do Laboratório de Bacteriologia Veterinária, em destaque o microscópio de campo escuro e a capela de fluxo laminar.



Fonte: Arquivo Pessoal (2023)

A sala de extração de DNA fica isolada das outras áreas (figura 2), dispendo de uma Luminária de Raio Ultravioleta C Germicida (G-light) para descontaminação, além disso, dispõe de uma centrífuga (Eppendorf® 5810 R. 15amp version), de um vórtex (LHNH UNISCIENCE UniVortex) e de um banho seco (KASVI).

Figura 2. Sala de extração de DNA do Laboratório de Bacteriologia Veterinária.



Fonte: Arquivo Pessoal (2023)

A sala de biologia molecular (figura 3) dispõe de três freezers e duas geladeiras, além disso há também um micro-ondas para o preparo de gel de agarose, duas cabines (AirClean®Systems – Ciencor) para a realização do preparo das amostras de PCR, quatro termocicladores (QIAGEN® QIAamplifier 96), uma centrífuga de alta velocidade (Loccus), uma estufa bacteriológica (SOLAB SL-101), uma centrífuga de tubos(CENTRIBIO 80-2B), uma cuba de eletroforese (PWSys PW600) e um transiluminador (LIFE TECHNOLOGIES TM TFX-35M).

Figura 3. Sala de Biologia Molecular do Laboratório de Bacteriologia Veterinária.



Fonte: Arquivo Pessoal (2023).

1.3.Descrição das atividades

Durante a realização do ESO foi possível acompanhar toda a rotina do LaBV, desde as atividades de pesquisa em desenvolvimento às análises da rotina clínica. A tabela 1 demonstra o quantitativo de espécies que foram avaliadas sorologicamente, pela técnica de SAM, para diagnóstico sorológico da leptospirose, durante a vigência do estágio.

Tabela 1. Espécies animais avaliadas pela Técnica de Soroaglutinação Microscópica durante o período do Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO).

| Espécie Animal | Quantidade | Positivos | Percentual de animais positivos (%) |
|-----------------------|-------------------|------------------|--|
| Canina | 72 | 20 | 26,87 |
| Equina | 28 | 13 | 10,44 |
| Bovina | 168 | 113 | 62,69 |
| Total | 268 | 146 | 100 |

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Além da sorologia, foi possível acompanhar atividades que estavam sendo desenvolvidas, destacando a manutenção das culturas vivas de *Leptospira* spp. e a PCR, visando o diagnóstico da Leptospirose em animais com suspeita clínica e para a pesquisa. As atividades realizadas estão dispostas na tabela 2.

Tabela 2. Atividades desenvolvidas e/ou acompanhadas durante o período do Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO)

| Atividade | Frequência | Percentual (%) |
|--|-------------------|-----------------------|
| Avaliação de culturas | 144 | 19,83% |
| Repique de culturas | 144 | 19,83% |
| Preparo de meios de cultura | 1 | 0,13% |
| Preparo e armazenamento de culturas em nitrogênio líquido (-196°C) | 1 | 0,13% |
| Soroaglutinação Microscópica (SAM) | 268 | 36,93% |
| Extração de DNA | 50 | 6,9% |
| Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) | 88 | 12,12% |
| Purificação de DNA para sequenciamento | 30 | 4,13% |
| Total | 726 | 100% |

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

1.3.1. Produção de Meios de Cultivo

Para garantir o sucesso no cultivo microbiológico é indispensável utilizar o meio ideal para o microrganismo de eleição (Tortora, Funke, Case., 2016). No que consiste o cultivo de *Leptospira* spp. podem ser utilizados os meios Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH), enriquecido ou não com um coquetel de antibióticos (*Staff*), descritos na tabela 3, Fletcher e o meio T80/40LH.

Os meios EMJH e EMJH enriquecido com *Staff* são os mais utilizados para o cultivo, o meio Fletcher é suplementado com soro de coelho para aumentar a quantidade de nutrientes disponíveis às bactérias, e o T80/40LH é mais utilizado para o isolamento de espécies de *Leptospira* fastidiosas e de amostras a campo. Para a produção de todos os meios, são seguidas as instruções do fabricante e posterior ajuste de pH, após isso são armazenados a 5°C por até 3 meses.

Tabela 3. Componentes do coquetel *Staff* utilizado para cultivo de *Leptospira* spp.

| Reagente | Volume/1000ml |
|----------------|---------------|
| Sulfametoxazol | 0,4g |
| Trimetropim | 0,2g |
| Anfotericina B | 0,05g |
| Fosfomicina | 4g |
| 5-Fluoracil | 1g |

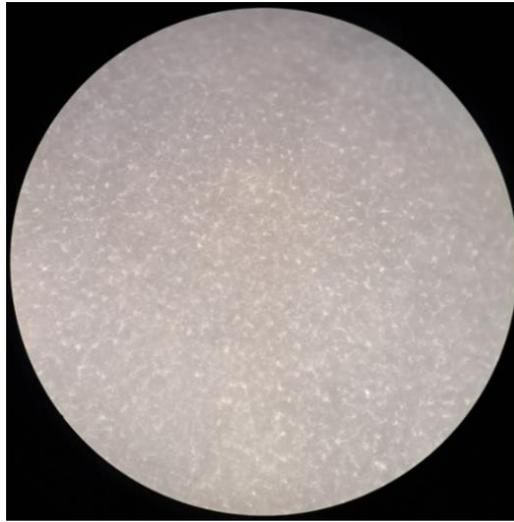
Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

1.3.2. Manutenção de culturas de *Leptospira*

O cultivo de *Leptospira* spp. é um dos maiores desafios para pesquisadores e laboratórios de microbiologia, isso devido às características da bactéria que tem crescimento lento e fastidioso (Steinparzer et al., 2021), entretanto é de extrema importância para compreensão epidemiológica do agente em um determinado local (Sykes et al., 2022). A manutenção das culturas é indispensável para o sucesso da realização da SAM, visto que a sua qualidade é essencial para o teste.

Nesse contexto, foi realizada a avaliação das culturas semanalmente, avaliando a relação entre a quantidade e viabilidade das bactérias e a quantidade de contaminantes. Foi utilizado uma escala de 1 a 4 para os dois parâmetros, sendo o resultado da avaliação dados em proporção na forma qualidade de *Leptospira* spp. para a presença de contaminantes. Na figura 4 é possível observar um campo representando uma cultura 4:0, onde há uma grande quantidade de *Leptospiras* e nada de contaminantes.

Figura 4. Avaliação de cultura de *Leptospira* spp. apresentando uma grande quantidade de bactérias e ausência de contaminantes.



Fonte: Arquivo Pessoal (2023).

A partir desses resultados foi realizada a manutenção, podendo a cultura ser mantida ou realizados os repiques ou o descarte. Os repiques podem ser em meio EMJH enriquecidos com *Staff*. Porém, pode ser realizado o repique em meios sem *Staff*, sendo essa alternativa utilizada quando a viabilidade da amostra estava baixa, com o intuito de não prejudicar o desenvolvimento do agente e perda da amostra.

Para o repique, foram utilizados 500 μL da cultura em 5 mL de meio EMJH. Todas essas etapas foram, obrigatoriamente, realizadas em capela de proteção biológica com fluxo de ar laminar, para a segurança do manipulador e para evitar a contaminação das culturas (Figura 5).

A conservação de culturas das bactérias é realizada em nitrogênio líquido (-196°C). Para essa finalidade, foram aliqüotadas, em criotubo de 2 mL, 975 μL de culturas vivas, viáveis de *Leptospira* spp e 25 μL de Dimetilsulfóxido (DMSO). O meio contendo bactérias e crioprotetor foi homogeneizado levemente e armazenado em botijão de nitrogênio líquido (ET-40 MVE). Para a reativação das amostras os meios foram descongelados em temperatura ambiente e realizado o repique em EMJH e *Staff*.

Figura 5. Manipulação de culturas em capela de proteção biológica com fluxo de ar laminar



Fonte: Arquivo Pessoal (2023).

Figura 6. Rack para o armazenamento de *Leptospira* spp. em nitrogênio líquido (-196°C)



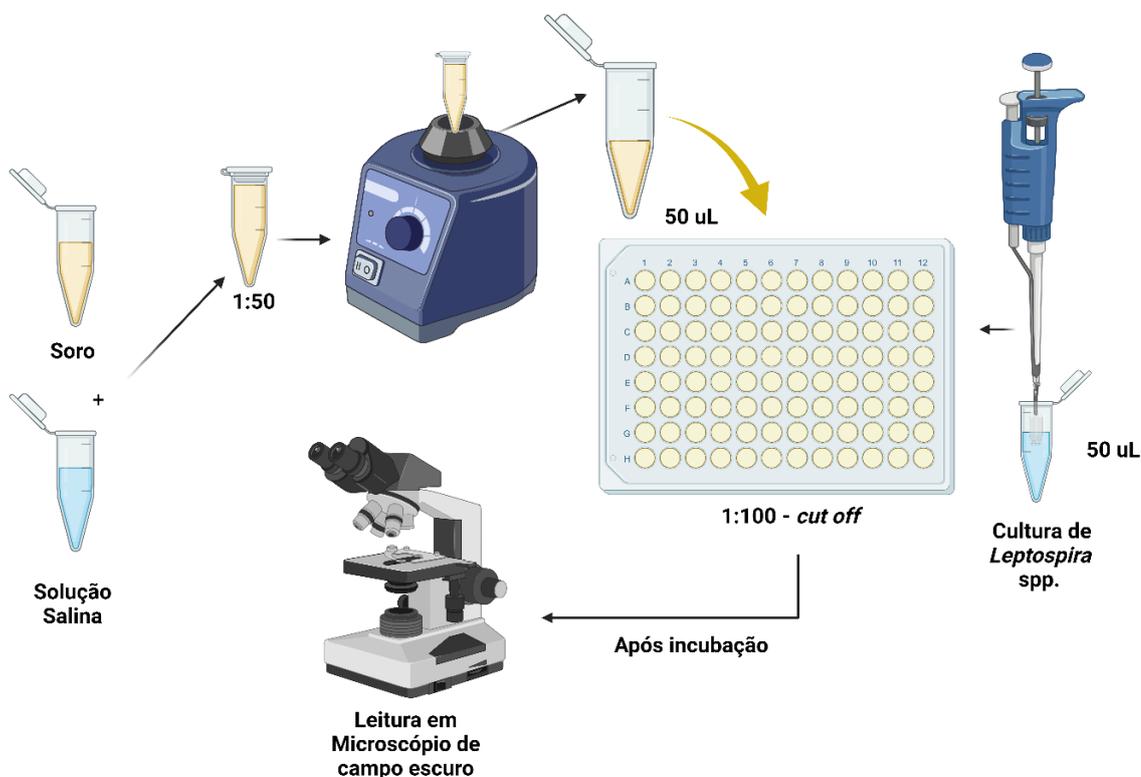
Fonte: Arquivo Pessoal (2023)

1.3.3. Soroaglutinação Microscópica (SAM)

A SAM foi realizada de acordo com o que está estabelecido pela Organização Mundial da Saúde Animal - OMSA (2021). Nesse contexto, para a execução do exame, foram utilizados o soro dos animais e culturas vivas de *Leptospira* spp. A leitura do teste foi feita em microscópio de campo escuro, após a incubação das amostras por uma hora e meia a 37°C.

Na figura 7 estão ilustradas as etapas de como foi realizada a SAM. Como a epidemiologia da leptospirose do estado do Rio de Janeiro já é bem estabelecida, foram utilizados os sorovares mais prevalentes da região em cada espécie. Dessa forma, para caninos foram utilizados os sorovares Canicola, Pomona, RGA e Copenhageni; para os equinos foram utilizados Canicola, Pomona, RGA, Copenhageni, Australis, Autumnalis, Guaricura e Grippytyphosa; e para bovinos foram utilizados Canicola, Pomona, RGA, Copenhageni, Australis, Autumnalis, Guaricura, Grippytyphosa e Hardjo.

Figura 7. Desenho esquemático das etapas realizadas para a Soroaglutinação Microscópica



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

O soro foi diluído em uma proporção de 1:50, sendo utilizados 20 µL de soro e 980 µL de solução salina. Posteriormente, 50 µL dessa diluição foram depositados em placas de poços contendo 50 µL de culturas de *Leptospira spp.* A placa foi incubada em estufa bacteriológica a 37°C por uma hora e meia. Na figura 8 estão os materiais necessários para a SAM.

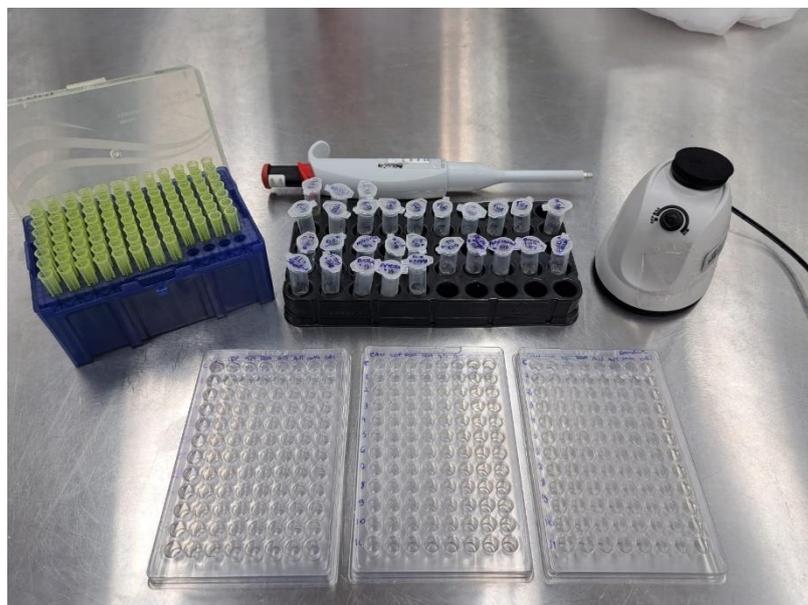
Figura 8. Materiais necessários para realização da Soroaglutinação Microscópica (SAM).



Fonte: Arquivo Pessoal (2023)

A placa de poços foi devidamente identificada com os sorovares a serem testados, o controle e a identificação dos animais (Figura 9)

Figura 9. Placa de poços preparada para depósito das amostras para a realização da Soroaglutinação Microscópica.



Fonte: Arquivo Pessoal (2023)

O ponto de corte, ou *cut off*, varia de acordo com a espécie, para caninos e equinos, o animal foi considerado reagente quando houve aglomeração de 1:200, para bovinos, por conta

da individualidade da espécie, considerou-se 1:100. Animais com titulação entre 1:200 e 1:400 foram considerados fracos reagentes e acima de 1:800 fortes reagentes.

1.3.4. Sorogrupagem de culturas de *Leptospira* spp.

A sorogrupagem é a técnica utilizada para a determinação dos sorogrupos, visto que nesse teste se realiza uma SAM com antissoros contendo anticorpos anti-*Leptospira* spp. sorovar específico (Royal Tropical Institute – KIT), podendo realizar a caracterização sorológica das estirpes e dos isolados clínicos (Faine et al., 2000).

Os antissoros foram reconstituídos com água destilada e, inicialmente, diluídos em solução salina em uma proporção de 1:25, posteriormente foram diluídos novamente em solução salina, na proporção final de 1:400. Após isso, 50µL de antissoro foram depositados em microplaca de 96 poços junto a 50µL da cultura a ser testada, com diluição final de 1:800. As placas foram incubadas a 37°C por duas horas e a leitura foi realizada em microscópio de campo escuro.

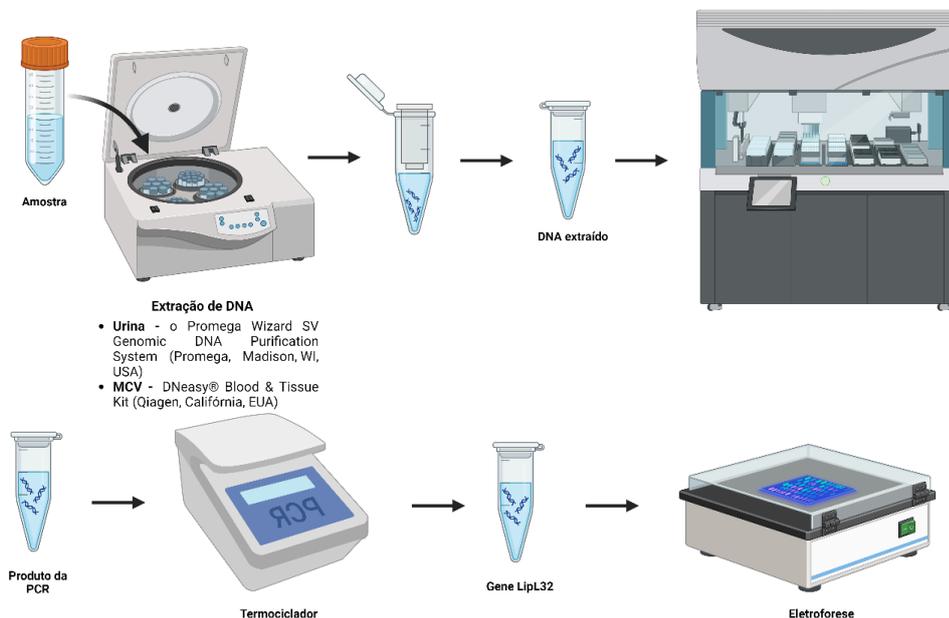
As amostras que apresentaram aglutinação maior ou igual a 50% foram consideradas reagentes e quando houve reação a vários sorovares do mesmo sorogrupo foi realizada uma outra titulação, nesse caso de 1:1600 até 1:204.800 com intuito de verificar o sorovar mais provável.

1.3.5. Diagnóstico Molecular da infecção por *Leptospira* spp.

Para a extração do DNA das amostras a serem testadas para a presença do DNA de *Leptospira* spp. foram utilizados os kits DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen, Califórnia, EUA), para Muco Cervico Vaginal (MCV) e útero, e o Promega Wizard SV Genomic DNA Purification System (Promega, Madison, WI, USA) para urina e outros tecidos.

O gene *LipL32* é o gene de eleição para o diagnóstico da leptospirose, sendo encontrado apenas em espécies de *Leptospiras* patogênicas (Guernier et al., 2018), já o *SecY* é o gene de eleição para caracterização da espécie, por conta de suas características desejáveis, visto que apresenta maior polimorfismo comparado ao *LipL32* (Di Azevedo; Lilenbaum., 2021). No desenho esquemático (Figura 10), estão exemplificadas as etapas para a realização da PCR.

Figura 10. Etapas para a realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para o diagnóstico de leptospirose.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Os primers utilizados para o gene *LipL32* foram descritos por Stoddard et al. (2009) (*LipL32_45F* - 5'AAG CAT TAC TTG CGC TGG TG 3' e *LipL32_286R* - 5'TTT CAG CCA GAA CTC CGA TT 3'), como controle positivo é utilizada a cepa *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni (str. Fiocruz L1-130), que abre um fragmento de 242 pb. Na tabela 4 estão dispostos todos os componentes da PCR, assim com seus respectivos volumes necessários para a realização da reação.

Tabela 4. Reagentes para o preparo do mix da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com enfoque no gene *LipL32* para detecção do DNA de espécies patogênicas de *Leptospira*.

| Reagente | Volume (µL) |
|-------------------|-------------|
| Buffer | 1,25 |
| MgCl ₂ | 2 |
| dNTP | 1,25 |
| Primer F | 0,75 |
| Primer R | 0,75 |
| Taq | 0,2 |
| DNA | 3 |
| H ₂ O | 3,3 |

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

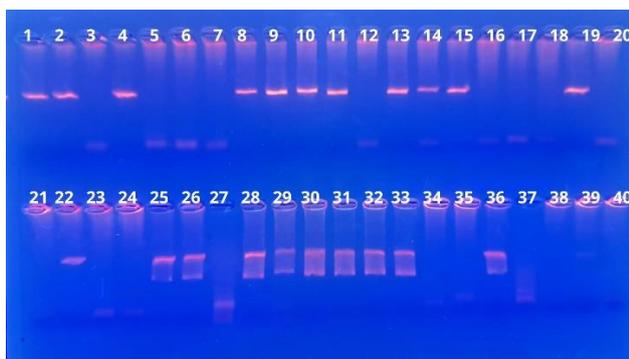
Após o preparo do mix, os criotubos foram depositados em termociclador. Na tabela 5 estão dispostas as etapas e o perfil térmico utilizado. Após o término da reação, as amostras podem ser congeladas ou seguir para a eletroforese, em gel de agarose a 1,5%, a 100V, 150 mA e 120 W, por 40 minutos. Foram utilizados 3µL de Gel Red (Gel RedTM Nucleic Acid - BIOTIUM), 3uL de Azul de Bromo (6x Gel Loading Dye - Sinapse inc.) e 10 µL de produto da PCR. O resultado foi revelado em transiluminador (LIFE TECHNOLOGIES TM TFX-35M (Figura 11).

Tabela 5. Etapas realizadas para amplificação do gene LipL32 de espécies patogênicas de *Leptospira*.

| Etapas | Temperatura | Tempo | |
|--------------------------|--------------------|--------------|---------------|
| Desnaturação Inicial | 94°C | 2 min | |
| Desnaturação | 94°C | 30 seg | } x 40 Ciclos |
| Hibridização dos Primers | 53°C | 30 seg | |
| Extensão | 72°C | 1 min | |
| Extensão Final | 72°C | 5 min | |
| Temp. de Manutenção | 4°C | ∞ | |

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Figura 11. Revelação do gene *SecY* – *outer* em gel de agarose a 1,5%.



Fonte: Arquivo Pessoal (2023)

1.3.6. Identificação da Espécie

Para a identificação da espécie de *Leptospira* são selecionadas as amostras que previamente foram positivas na PCR para o gene *LipL32*. Inicialmente é realizado uma Nested PCR com foco no gene *SecY*, que apresenta características desejáveis para essa finalidade, sendo menos conservado quando comparado ao *LipL32*, o que implica em um melhor marcador taxonômico. Então, é conduzida uma amplificação usando os primers

secY_outerF (5'-ATGCCGATCATTTTTGCTTC-3') e *secY_outerR* (5'-CCGTCCTTAATTTTAGACTTCTTC-3'), de acordo com o descrito por Ahmed et al. (2009) e, posteriormente, os amplicons são incluídos em uma segunda reação, utilizando os primers *secY_inner_F* (5'-CCTCAGACGATTATTCAATGGTTATC-3') e *secY_inner_R* (5'-AGAAGAGAAGTTCCACCGAATG-3') (Grillová et al., 2020). Na tabela 6 estão dispostos todos os componentes da PCR, assim como seus respectivos volumes necessários para a realização da reação.

Tabela 6. Reagentes para o preparo do mix da NestedPCR com enfoque no gene *SecY-outer* e *SecY-inner*

| Reagente | <i>SecY-outer</i> | <i>SecY-inner</i> |
|-------------------|--------------------------|--------------------------|
| Buffer | 2,5uL | 5uL |
| MgCl ₂ | 1,75 uL | 3 uL |
| dNTP | 1,5 uL | 2 uL |
| Primer F | 1 uL | 1 uL |
| Primer R | 1 uL | 1 uL |
| Taq | 0,3 uL | 0,2 uL |
| DNA | 3 uL | 5 uL |
| H ₂ O | 12,5 uL | 32. 8 uL |

Fonte: Elaborada pelo autor (2024).

Nas tabela 7 e 8 estão dispostas as etapas e o respectivo perfil térmico para a PCR com foco nos genes *SecY-outer* e *SecY-inner*.

Tabela 7. Etapas realizadas para amplificação com os primers *SecY-outer*

| Etapas | Temperatura | Tempo | |
|--------------------------|--------------------|--------------|---------------|
| Desnaturação Inicial | 94°C | 5 min | |
| Desnaturação | 94°C | 30 seg | } x 40 Ciclos |
| Hibridização dos Primers | 54°C | 30 seg | |
| Extensão | 72°C | 45 seg | |
| Extensão Final | 72°C | 5 min | |
| Manutenção | 4°C | ∞ | |

Fonte: Elaborada pelo autor (2024).

Tabela 8. Etapas realizadas para amplificação com os primers SecY-inner

| Etapas | Temperatura | Tempo | |
|--------------------------|--------------------|--------------|---------------|
| Desnaturação Inicial | 94°C | 5 min | |
| Desnaturação | 94°C | 30 seg | } x 35 Ciclos |
| Hibridização dos Primers | 54°C | 30 seg | |
| Extensão | 72°C | 45 seg | |
| Extensão Final | 72°C | 5 min | |
| Manutenção | 4°C | ∞ | |

Fonte: Elaborada pelo autor (2024).

As amostras que forem positivas para o gene *SecY* são purificadas com o Kit PCR Clean-Up System (Promega, EUA), de acordo com as instruções do fabricante, e destinadas à identificação da espécie. As reações de sequenciamento são realizadas em parceria com a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) usando o kit Big Dye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, EUA) em um sequenciador automático de DNA 3100 de acordo com as instruções do fabricante.

A ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST - NCBI, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) é utilizada para identificar as espécies de *Leptospira* spp. com base na similaridade de nucleotídeos. As sequências do gene *SecY* são selecionadas no GenBank e selecionadas para a análise filogenética e o alinhamento das sequências é realizado no software ClustalX v 2.0 (Larkin et al. 2007)

Após o término da reação as amostras podem ser congeladas ou seguir para a eletroforese, em gel de agarose a 1,5%, a 100V, 150 mA e 120 W, por 40 minutos. Foram utilizados 3µL de Gel Red (Gel RedTM Nucleic Acid - BIOTIUM), 3µL de Azul de Bromo (6x Gel Loading Dye - Sinapse inc.) e 10 µL de produto da PCR. O resultado foi revelado em transiluminador (LIFE TECHNOLOGIES TM TFX-35M) e fotodocumentado.

1.4. Discussão das atividades desenvolvidas

De acordo com o que foi exposto, é possível perceber que a sorologia foi a técnica mais trabalhada durante o período do estágio, além disso, a espécie bovina foi a mais avaliada, frequência (62,69%), demonstrando a importância da técnica para o diagnóstico da Leptospirose, sendo essa preconizada pela OMSA (2021).

A SAM é uma técnica sorológica efetiva para o diagnóstico da Leptospirose, especialmente para a doença na forma aguda, quando se tem a leptospiremia, com consequente aumento da produção de anticorpos, e desse modo, uma reação mais efetiva (Furquim; Santos; Mathias, 2020). Portanto é uma técnica onde ocorre a reação entre o antígeno, utilizando culturas vivas de *Leptospira* spp. e os anticorpos, presentes no soro do animal, sendo mais sensível para a classe IgM (Levett, 2001).

Para que a sorologia seja efetiva a manutenção das culturas de bactéria é necessária. Desse modo, a avaliação dos meios quanto à concentração de *Leptospira* spp. viáveis e a relação entre a quantidade de bactérias e contaminantes se torna indispensável. Ademais, providenciar um banco de amostras é imprescindível, visto que o cultivo de *Leptospira* spp. ainda é um desafio por conta de características individuais do agente (Faine et al., 2000; Di Azevedo; Lilenbaum, 2020).

Apesar de ser uma técnica efetiva para o diagnóstico, e ainda a mais utilizada, a SAM é pouco sensível para a detecção de quadros crônicos da doença (Nally et al., 2018), além disso, uma outra desvantagem está relacionada a não diferenciação dos anticorpos vacinais (Martin et al., 2014). Sendo assim, com o avanço da biologia molecular, é possível usufruir da PCR com o intuito de fechar um diagnóstico mais sensível para a leptospirose, especialmente em animais que apresentem um quadro clínico crônico da doença (Di Azevedo; Lilenbaum, 2020).

O gene de eleição para a realização da PCR é o *LipL32*, presente apenas em espécies de *Leptospira* patogênicas (Stoddard et al., 2009). A nível de rotina, os testes são realizados apenas para esse gene, entretanto, quando se fala em pesquisa, é realizada também a PCR com foco no gene *SecY*, sendo esse o mais utilizado para o sequenciamento, sendo um marcador genético eficiente para identificação das espécies de bactérias do gênero *Leptospira* (Di Azevedo; Lilenbaum, 2021).

O gene *SecY* não é específico das *Leptospiras*, podendo ser encontrado em outras bactérias, por conta disso, deve ser realizada a PCR para o gene *LipL32*, antes de realizar a pesquisa do gene *SecY*. Entretanto, ele é um gene com maior polimorfismo comparado ao *LipL32*, o que infere em um melhor marcador taxonômico, devido às variações que ocorrem entre os diversos sorovares de *Leptospira* já registrados (Di Azevedo; Lilenbaum, 2021).

A realização da caracterização genética é fundamental, isso porque, a partir do resultado dessa análise, é possível compreender o gênero *Leptospira* a nível de espécie em um local específico, contribuindo para o entendimento epidemiológico da região (Di Azevedo et

al., 2023). Sendo assim, é possível pressupor quais as possíveis formas de transmissão e compreender a cadeia epidemiológica de uma forma geral.

A leptospirose é uma doença de grande impacto na saúde pública, refletindo também na cadeia de produção, visto que, ao atingir os animais de produção, acarreta gastos com diagnóstico e tratamento de indivíduos doentes (Sohm et al., 2023). O LaBV tem suas atividades de pesquisa focadas apenas em animais de produção, visando mais especificamente a Leptospirose Genital.

Desse modo, foi possível acompanhar os estudos realizados na área, além da oportunidade de realizar um estudo sorológico do agente em jumentos do estado de Pernambuco, com o intuito de entender a frequência sorológica dos animais do estado, compreendendo o estado sorológico e quais os sorogrupos estão circulando na região.

CAPÍTULO II

Detecção de anticorpos anti-*Leptospira* spp. EM ASININOS (*Equus asinus*) do estado de Pernambuco - Brasil.

2.1. Resumo

A população de asininos vem diminuindo exponencialmente devido aos avanços tecnológicos, entretanto, esses animais ainda são utilizados para trabalho em pequenas propriedades. No Brasil, a maior população de jumentos está concentrada na região Nordeste. Nesse sentido, é importante realizar estudos sobre a sanidade dessa espécie, pois o contato com os seres humanos acende uma preocupação importante na transmissão de zoonoses. A leptospirose é uma zoonose causada por bactérias do gênero *Leptospira*, que acomete, principalmente, os mamíferos, e apresenta características epidemiológicas que favorecem a transmissão aos seres humanos. Dessa forma, torna necessário compreender quais os sorogrupos que estão acometendo os asininos no estado de Pernambuco. Para isso, objetivou-se com esse trabalho pesquisar a frequência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em jumentos de duas propriedades situadas no estado de Pernambuco pela técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM). Utilizou-se 25 amostras de soro de asininos, sendo testados os seguintes sorovares: Canicola, Copenhageni, Pomona, RGA, Australis, Autumnalis, Guaricura, Grippytyphosa, Verdum, Hardjobovis, Hardjoprajitano e Bratislava, com o intuito de realizar uma triagem nos rebanhos. As amostras que apresentaram atividade aglutinante 1:100 foram consideradas reagentes para anticorpos anti-*Leptospira* spp. Na primeira propriedade, três animais (30%) apresentaram reação positiva no teste, na segunda, 14 animais (93,33%) foram reagentes. Como os resultados da SAM são expressos em sorogrupos, no geral, foi observado nas propriedades testadas na Zona da Mata e Agreste Pernambucano, a ocorrência do sorogrupo Australis (44%), Sejroe (12%), Autumnalis (8%) e Icterohaemorrhagiae (4%). Nesse sentido, a realização da SAM como método de triagem auxilia no diagnóstico mais assertivo da infecção nos rebanhos. Nas duas propriedades estudadas foi demonstrada a complexidade da leptospirose e sua diversidade de sorogrupos. Sendo assim, é necessário que todos os animais do rebanho 2 sejam testados individualmente para poder traçar um perfil epidemiológico e assim compreender a real situação do rebanho frente a essa importante enfermidade.

Palavras chaves: Leptospirose; jumentos; sorologia; rebanho

Abstract

The population of donkeys has been decreasing exponentially due to technological advances, however, these animals are still utilized for work on small properties. In Brazil, the largest population of donkeys is concentrated in the Northeast region. In this context, it is important to conduct studies on the health of this species, as their interaction with humans raises significant concerns regarding the transmission of zoonotic diseases. Leptospirosis is a zoonotic disease caused by bacteria of the genus *Leptospira*, primarily affecting mammals, and it has epidemiological characteristics that facilitate transmission to humans. Therefore, it becomes necessary to understand which serogroups are affecting donkeys in the state of Pernambuco. To achieve this, the aim of this study was to investigate the occurrence of anti-*Leptospira* spp. antibodies in donkeys from two properties located in the state of Pernambuco using the Microscopic Agglutination Test (MAT) technique. Twenty-five serum samples from donkeys were tested for the following serovars: Canicola, Copenhageni, Pomona, RGA, Australis, Autumnalis, Guaricura, Grippotyphosa, Verdum, Hardjobovis, Hardjoprajitano, and Bratislava, with the purpose of screening the herds. Samples showing agglutination activity at a 1:100 dilution were considered reactive for anti-*Leptospira* spp. antibodies. In the first property, three animals (30%) showed a positive reaction in the test, while in the second, 14 animals (93.33%) were reactive. As the results of the MAT are expressed in serogroups, overall, in the properties tested in the Zona da Mata and Agreste regions of Pernambuco, the occurrence of the Australis serogroup (44%), Sejroe (12%), Autumnalis (8%), and Icterohaemorrhagiae (4%) was observed. In this context, the use of MAT as a screening method aids in a more accurate diagnosis of this disease in herds. In both properties studied, the complexity and diversity of Leptospirosis serogroups were demonstrated. Therefore, it is necessary to individually test all animals in herd 2 to establish an epidemiological profile and understand the actual situation of the herd concerning this important disease.

Keywords: Leptospirosis; donkeys; serology; herd

2.2. Introdução

A leptospirose é uma doença causada por bactérias do gênero *Leptospira*, atualmente distribuída em todo o mundo (Bradley; Lockaby, 2023), desse modo, representa um grande desafio a nível de saúde pública. O ciclo de transmissão do agente ocorre pelo contato ou ingestão de água contaminada, assim como o contato com fluídos de animais infectados (Chiani et al. 2023; Díaz et al. 2023). Em todos os casos, o ser humano é um hospedeiro acidental, podendo ser considerada uma doença ocupacional e negligenciada (Karpagam; Ganesh, 2020; Strand et al., 2023).

Apesar de convencionalmente ser associada majoritariamente aos roedores, os animais de companhia e de produção são amplamente afetados pela doença, participando ativamente do ciclo epidemiológico, representando um problema no contexto da Saúde Única devido ao contato próximo desses com os seres humanos (Azócar-Aedo, 2023). Para os animais de produção espera-se a queda da produtividade e, na sua forma crônica, os problemas da esfera reprodutiva, trazendo consequências econômicas ao produtor (Aymée et al. 2023).

Os equídeos, de maneira geral, apresentam quatro formas clínicas descritas, sendo elas: a ocular, na qual o animal manifesta a uveíte; a hepatorenal, marcada pela icterícia; a pulmonar, associada a um quadro respiratório agudo e a síndrome reprodutiva, que pode resultar em abortos, natimortos, potros fracos, repetição de estro e outras perdas gestacionais. (Broux et al., 2012; Divers, 2022; Gilger; Degroote; Deeg, 2022; Hamond et al., 2015).

Em relação aos jumentos (*Equus asinus*), há poucos estudos que buscaram investigar a relação desses animais frente à infecção por *Leptospira* spp. (Morais et al., 2023). Porém, eles estão presentes no dia a dia de muitos pequenos produtores, inclusive na região Nordeste do Brasil. Desta forma, é importante entender o perfil sorológico desses animais para a compreensão do papel epidemiológico deles no ciclo de transmissão e manutenção da doença (Daddy et al., 2020).

Na região Nordeste do Brasil já se tem alguns trabalhos demonstrando que os asininos são acometidos pela doença, no estado da Paraíba e no sertão de Pernambuco (Galvão et al., 2022; Moraes et al., 2019, Moraes et al., 2023). Porém, o estado pernambucano é subdividido em três mesorregiões, sendo elas o Sertão, o Agreste e a Zona da Mata (Lopes et al., 2017), tornando-se necessário realizar a pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em todos eles, para que seja possível a compreensão epidemiológica do estado como um todo.

Dessa forma, pouco se sabe sobre o perfil sorológico da leptospirose nos rebanhos de asininos do estado de Pernambuco. Então, o presente trabalho buscou realizar uma investigação sorológica, pela técnica de Soroaglutinação Microscópica, de asininos para a triagem da infecção por *Leptospira* spp. em duas propriedades localizadas na zona da mata e no agreste do estado, com intuito de entender a frequência de anticorpos anti-*Leptospira* spp em asininos de Pernambuco.

2.3. Revisão de Literatura

A população estimada de asininos, no Brasil, em 2017, contabilizava, aproximadamente, 376.874 animais (Queiroz; Gameiro; Zanella, 2020). Já o quantitativo mundial, em 2021, apresentava 50.451.887 cabeças (Norris et al. 2021). O Brasil apresenta uma problemática importante em relação aos jumentos, por conta do declínio populacional, devido ao abate para a importação de carne e pele para a China, o que levou a quase extinção da espécie no território nacional (Gameiro; Rezende; Zanella., 2021).

Os jumentos são amplamente utilizados em todo o mundo, não apenas para trabalho, mas também para o consumo humano, seja do leite ou da carne (Maggs; Ainslie; Bennett, 2023). O leite de jumenta apresenta propriedades desejáveis, sendo semelhante ao leite humano, manifestando características antioxidantes, antimicrobianas e antifúngicas (Baloš et al., 2023). Sendo assim, essa espécie está amplamente em contato com os seres humanos, o que acende a preocupação em relação a prevenção e a transmissão de doenças infecciosas por esses animais (Câmara et al., 2020; Ngetich; Chepkirui, 2020).

As doenças que atingem os jumentos são semelhantes à dos cavalos e mulas, entretanto, há algumas diferenças importantes na forma com a qual esses animais as expressam (Câmara et al., 2020). Diferentemente dos equinos, na maioria das vezes, os asininos não apresentam sinais clínicos típicos das enfermidades, o que lhes concede a falsa fama de resistentes (Barrandeguy; Carossino, 2018).

Avançando para a compreensão da enfermidade em questão sabe-se que a leptospirose é uma doença que pode atingir todos os animais de uma área (Cilia et al., 2021). Portanto, investigações em relação ao patógeno são inevitáveis para o conhecimento do estado epidemiológico de uma região (Sykes et al., 2022). Os jumentos, assim como os cavalos, são afetados pela *Leptospira* spp. o que concede a eles um papel importante no ciclo de transmissão e manutenção do agente (Morais et al., 2023).

Apesar dessa importância do ponto de vista epidemiológico, há poucos trabalhos disponíveis que buscam estudar a relação da leptospirose em asininos. Sabe-se que atualmente os métodos diagnósticos da doença são diretos, PCR e cultura de amostras clínicas, e indiretos, como a SAM. Sendo assim, demonstra-se na Tabela 1 os trabalhos que foram realizados desde 2000 até 2023, que tiveram êxito no diagnóstico da leptospirose em jumentos.

Tabela 1. Estudos publicados que tiveram êxito no diagnóstico da leptospirose em asininos entre os anos 2000 e 2023.

| Local | Técnica | Material | Sorogrupo/Espécie | Autor |
|---------------|----------------|--|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Iran | SAM | Soro | Grippothyphosa | Hajikolaei et al., 2005 |
| Marrocos | SAM | Soro | Australis | Benkirane et al., 2014 |
| Brasil | SAM | Soro | Panama | Filho et al., 2014 |
| Egito | SAM | Soro | Serjoe | Haggag et al., 2015 |
| Egito | SAM | Soro | Canicola | Samir et al., 2015 |
| Caribe | PCR | Urina | - | Grevenmeyer et al., 2016 |
| Lituânia | SAM | Soro | Grippotyphosa e Celledoni | Stankevičienė et al., 2016 |
| México | SAM | Soro | Icterohaemorrhagiae | Alvarado-Esquivel et al., 2018 |
| Senegal | SAM | Soro | Icterohemorrhagiae | Roqueplo et al., 2019 |
| Brasil | SAM | Soro | Icterohaemorrhagiae | Lara et al., 2019 |
| Brasil | SAM | Soro | Icterohemorrhagiae | Morais et al., 2019 |
| Brasil | SAM | Soro | Australis | Morais et al., 2019 |
| África do Sul | SAM | Soro | Bratislava | Daddy et al., 2020 |
| Irã | SAM | Soro | Canicola | Maleki; Zakian; Abdollahpour, 2021 |
| Brasil | SAM | Soro | Tarassovi | Pires et al., 2022 |
| Brasil | SAM | Soro | Pomona | Galvão et al., 2022 |
| Brasil | SAM | Soro | Djasiman | Romanowski et al., 2023 |
| Itália | qPCR | Urina | Leptospira interrogans sorovar Pomona | Piredda et al., 2023 |
| Itália | Cultura | Urina | Leptospira montravelensis | Piredda; Bertoldi; Chisu et al., 2023 |
| Brasil | PCR/Cultura | Soro/ Urina/Líquido Vagina/Líquido Preucial | - | Morais et al., 2023 |

SAM: Soroaglutinação Microscópica; qPCR: Reação de Cadeia da Polimerase em Tempo Real; PCR: Reação de Cadeia da Polimerase

É possível perceber que a sorologia ainda é o método mais utilizado para o diagnóstico da leptospirose nos asininos. Loureiro; Lilenbaum (2020) discutiram em seu trabalho uma nova síndrome da doença, a Leptospirose Genital Bovina, Di Azevedo; Lilenbaum (2022) trazem à tona a síndrome reprodutiva nos equinos. Em ambos os casos, a SAM deve ser utilizada apenas como triagem de rebanho, não sendo sensível para o diagnóstico da leptospirose genital.

A presença de *Leptospira* spp. no trato genital de jumentos foi descrita pela primeira vez por Morais et al., (2023), que teve êxito no isolamento de bactérias em materiais provenientes do trato reprodutivo. Desse modo, é necessário que mais trabalhos sejam realizados, buscando entender o impacto da leptospirose genital nos asininos, além disso, realizar o sequenciamento genético do DNA isolado para que seja possível compreender quais são as principais espécies de *Leptospira* spp. que atingem esses animais, e comparar esses resultados com o que se tem disponível na literatura em cavalos.

2.4. Material e métodos

Comitê de Ética

O estudo foi realizado no LaBV da UFF, respeitando todos os aspectos éticos de uso de animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco, sob registro nº 2180100522

Coleta das amostras biológicas

As coletas foram realizadas em duas propriedades do estado de Pernambuco em animais assintomáticos e não vacinados. Na propriedade 1, situada no município de Carpina, Zona da Mata Pernambucana, foram coletados soros de todos os animais, 10. Na propriedade 2, localizada em Garanhuns, no Agreste Pernambucano, todos os animais estavam prenhas, as coletas foram por conveniência, no total foram coletados soros de 15 jumentas, de um rebanho de 29 animais.

As amostras de sangue foram obtidas pela veia jugular utilizando agulhas do tipo Vacutainer® em tubo com ativador de coágulo (5mL), após antissepsia do local. Posteriormente, foram centrifugadas a 1000 ×g por 10 minutos, aliqüotados em microtubos e armazenados a -20°C até o momento da realização do exame.

Análise Sorológica

Para pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira* spp. foi utilizada a técnica de Soroaglutinação Microscópica, segundo a Organização da Saúde Animal () (OMSA, 2021). Foram testados 12 sorovares, sendo eles: Canicola, Copenhageni, Pomona, RGA, Australis, Autumnalis, Guaricura, Grippotyphosa, Verdum, Hardjobovis, Hardjoprajitano e Bratislava.

Amostras que apresentaram atividade aglutinante 1:100 foram consideradas reagentes, seguindo para a titulação seriada, sendo o maior título correspondente ao sorogrupo.

2.5. Resultados

Dos 25 animais testados, 17 (68%) apresentaram titulação maior ou igual a 1:100. Dessa forma, na primeira propriedade três animais (30%) foram reagentes, enquanto na segunda propriedade, 14 (93,33%) apresentaram resultados positivos para anticorpos anti-*Leptospira* spp. Na tabela 1 estão dispostas as titulações encontradas na propriedade 1 e seus respectivos sorovares, um animal foi positivo para o sorovar RGA, um animal foi positivo para o sorovar Australis e outro positivo para o sorovar Autumnalis.

Tabela 1.: Resultado do teste de Soroaglutinação Microscópica (SAM) para detecção de anticorpos anti-*Leptospira* em asininos da propriedade 1, Zona da Mata Pernambucana.

| Animais | Título | | | |
|---------|--------|-------|-------|-------|
| | 1:100 | 1:200 | 1:400 | 1:800 |
| 1 | - | - | - | - |
| 2 | RGA | - | - | - |
| 3 | - | - | - | - |
| 4 | - | - | Aus | - |
| 5 | Aut | - | - | - |
| 6 | - | - | - | - |
| 7 | - | - | - | - |
| 8 | - | - | - | - |
| 9 | - | - | - | - |
| 10 | - | - | - | - |

RGA; Aut: Autumnalis; Aus: Australis.

Na tabela 2 estão dispostas as titulações encontradas na propriedade 2, onde 11 animais foram positivos para o sorovar Australis, dois animais para o sorovar Guaricura e um animal para o sorovar Hardjobovis.

Tabela 2. Resultado do teste de Soroaglutinação Microscópica (SAM) dos animais da propriedade 2

| Animais | 1:100 | 1:200 | 1:400 | 1:800 |
|----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 1 | Aus | - | - | - |
| 2 | - | Aus | - | - |
| 3 | - | Aus | - | - |
| 4 | - | - | - | Hb |
| 5 | - | Aus | - | - |
| 6 | Aus | - | - | - |
| 7 | Aus | - | - | - |
| 8 | Aus | - | - | - |
| 9 | - | Aus | - | - |
| 10 | - | Aus | - | - |
| 11 | - | - | - | - |
| 12 | - | Gua | - | - |
| 13 | - | Aus | - | - |
| 14 | - | Aus | - | - |
| 15 | Gua | - | - | - |

Aus: Australis; Gua: Guaricura; Hb: HHardjobovis

Sendo assim, de forma geral, 14 animais foram reagentes ao sorovar Australis, dois ao sorovar Guaricura, um ao sorovar RGA, um ao sorovar Hardjobovis. Demonstrando, desse modo, que o sorogrupo Australis foi o que mais ocorreu nos rebanhos testados. Entretanto os resultados da SAM são expressos a nível de sorogrupo. Portanto, foi detectado, nas propriedades testadas na Zona da Mata e Agreste Pernambucano, os sorogrupos Australis (44%), Sejroe (12%), Autumnalis (8%) e Icterohaemorrhagiae (4%).

2.6. Discussão

A SAM é um método importante para entender o estado sorológico a nível de rebanho, sendo utilizada como método de triagem (Loureiro; Lilenbaum, 2020). Na propriedade 1, os animais não apresentavam sinais clínicos condizentes com a doença na época em que foram coletadas as amostras. Entretanto, os resultados obtidos já indicam a circulação de *Leptospira* spp. na região, sendo então interessante implementar a vacinação desses animais para prevenção da leptospirose, visto que esses estão em contato contínuo com seres humanos e outros mamíferos, podendo ser carreadores do agente (Lara et al., 2019).

O sorogrupo Australis é considerado adaptado aos equinos (Romanowski et al., 2023), nesse caso, os animais não costumam apresentar a sintomatologia clássica da leptospirose, mas apresentam sinais crônicos, podendo refletir inclusive, em aspectos reprodutivos (Di Azevedo; Lilenbaum, 2022). Portanto, a condição sorológica da propriedade

2 é preocupante devido ao grande número de animais positivos na triagem para o sorogrupo em questão.

Pinna et al., (2013) constataram que, em éguas, a soropositividade à *Leptospira* spp. está associada a perdas reprodutivas em todas as fases da gestação. Entretanto, com o avanço da biologia molecular, o método ideal para o diagnóstico individual da leptospirose genital é a PCR, avaliando materiais provenientes do trato reprodutivo, podendo ser utilizado o muco cervicovaginal (MCV), a biópsia uterina e o sêmen (Loureiro; Lilenbaum, 2020). Desse modo, é indispensável que sejam realizados testes moleculares nos indivíduos do rebanho 2, visto que, com os resultados da SAM, foi constatado a circulação de *Leptospiras* spp. na propriedade.

A prevalência sorológica em asininos já foi estudada por Galvão et al., (2022), na região semiárida do nordeste brasileiro, onde o sorogrupo Pomona (79%) foi o mais prevalente, o Australis, por sua vez, foi detectado em apenas 6% dos animais positivos. Esses dados demonstram uma discrepância da situação sorológica em relação aos rebanhos desse estudo. Além disso, ilustra a complexidade epidemiológica da leptospirose, confirmando a importância de se realizar levantamentos sorológicos a fim de descobrir quais sorovares circulam nas diversas regiões (Jara et al., 2019).

Outros trabalhos realizados no Brasil demonstram os diferentes sorogrupos encontrados em asininos, podendo essas diferenças estarem relacionadas com a diversidade da fauna na região na qual os animais estão inseridos. No estado de São Paulo, Lara et al., (2019) detectou a ocorrência do sorogrupo Icterohaemorrhagiae em 41,2%, dos animais estudados. Pires et al., (2023), no estado de Minas Gerais detectou o sorogrupo Tarassovi (14,07%) com maior frequência em relação aos outros testados, o que novamente diverge dos resultados obtidos em Pernambuco frente aos animais testados nesse trabalho, além de destacar a importância de se conhecer quais os sorogrupos mais frequentes no estado.

Em pesquisa na mesorregião do sertão pernambucano, Moraes et al., (2019) identificaram que o sorogrupo mais frequente em asininos foi o Icterohaemorrhagiae (40,6%), e o Australis, por sua vez, apresentou apenas 27,5%, o que, outra vez, difere dos resultados obtidos nesse estudo. Portanto, além de levarmos em consideração a individualidade do rebanho, é importante pontuar a influência dos fatores externos como o manejo e o ambiente.

As diferenças entre a situação sorológica das regiões citadas acima podem estar relacionadas também às questões climáticas, sabendo da influência dessa no ciclo de transmissão da doença (Alvarado-Esquivel et al., 2018). O estado de Pernambuco apresenta

três mesorregiões, com diferenças importantes no que consiste ao índice de precipitação e caracterização pluviométrica (Lopes et al., 2017), sendo esses dados relevantes para traçar um estudo epidemiológico da leptospirose no estado de Pernambuco.

Outra característica epidemiológica importante a ser destacada em relação a propriedade 2 é a criação consorciada com bovinos e ovinos. Tal informação justifica a circulação e a detecção de anticorpos anti *Leptospira* spp pertencentes ao sorogrupo Sejroe nos asininos, visto que esse é um sorogrupo adaptado aos ruminantes e pode ser transmitida a outras espécies de forma acidental (Filho et al., 2014; Ellis., 2015).

Neste estudo foi observada alta frequência de anticorpos contra o sorogrupo Australis, indicando que os asininos amostrados podem ter sido expostos ao agente pelo contato com animais infectados ou animais considerados reservatórios, como animais silvestres e roedores. A falta de adoção de medidas sanitárias adequadas pode favorecer a ocorrência de infecção nos animais amostrados, além da observada consorciação entre espécies. Considera-se que novos estudos sorológicos e moleculares são necessários para se obter o real risco deste achado para os rebanhos estudados, já que pode ser considerado um sorogrupo adaptado à espécie em questão, levando a consequências de ordem reprodutiva.

2.7. Conclusão

A sorologia ainda é o método mais utilizado para o diagnóstico da leptospirose, conhecer o perfil sorológico de um rebanho é de extrema importância para a medicina veterinária preventiva. A realização da SAM como método de triagem auxilia no diagnóstico mais assertivo da infecção em rebanhos. Nas duas propriedades estudadas foram demonstradas a complexidade da leptospirose e sua diversidade de sorogrupos. Sendo assim, é necessário que todos os animais do rebanho 2 sejam testados individualmente para poder traçar um perfil sorológico e molecular, e assim compreender a real situação do rebanho frente a essa importante enfermidade.

Considerações Finais

A realização do Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) é indispensável para a formação do Médico Veterinário, contribuindo para a possibilidade de aperfeiçoamento do que foi ensinado durante todo o processo da graduação.

Sendo assim, finalizar essa etapa do curso no LaBV na UFF permitiu que o aluno se aprofundasse nas técnicas para o diagnóstico laboratorial, especialmente para o diagnóstico

da leptospirose. Além disso, acompanhar a rotina de um Laboratório contribuiu também para que, como futuro profissional, médico veterinário pesquisador, desenvolvesse a sensibilidade para perceber a importância da prevenção das doenças que trazem consequências reprodutivas, e como a medicina veterinária preventiva é aliada a esse processo.

Por fim, o convívio e o debate diário com pesquisadores da área possibilitaram o desenvolvimento do olhar crítico e científico, auxiliando, assim, na interpretação de dados e resultados de trabalhos científicos na área da medicina veterinária preventiva.

Referências

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

ALVARADO-ESQUIVEL, C; CRUZ-ROMERO, A; SALAS, D. R; ALVARADO-FÉLIX, A. O; AGUILAR-DOMÍNGUEZ, M; OCHOA-VALÊNCIA J. L; HERNÁNDEZ-TINOCO, J; BARBOZA-ZAMARRIPA, J. A; SÁNCHEZ-ANGUIANO, L. F. Apparently high *Leptospira* antibody seropositivity in donkeys for slaughter in three municipalities in Durango, Mexico. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 30, n. 6, p. 929–932, 2018.

AYMÉE, L; DI-AZEVEDO, M. I. N; REIS, L; MENDES, J; CASTRO, F. F. A; CARVALHO CASTRO, F. A; SOUZA, G. N; LILENBAUM, W. Unconventional Sites for Diagnosis of Leptospirosis in Bovine Anicteric Fetuses. **Animals**, v. 13, n. 18, p. 2832–2832, 6 set. 2023.

AZÓCAR-AEDO, L. Basic Aspects and Epidemiological Studies on Leptospirosis Carried Out in Animals in Chile: A Bibliographic Review. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 8, n. 2, p. 97, 1 fev. 2023.

BALOŠ, M. Ž; PELIC, D. L; JAKSIC, S; LAZIC, S. Donkey Milk: An Overview of its chemical composition and main nutritional properties or Human Health Benefit Properties. **Journal of Equine Veterinary Science**, p. 104225, jan. 2023.

BARRANDEGUY, M. E; CAROSSINO, M. Infectious Diseases in Donkeys and Mules: An Overview and Update. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 65, p. 98–105, jun. 2018.

- BENKIRANE, A; NOURY, S; HARTSKEERL, R. A; GORIS, G. A; AHMED, A; NALLY, J. E. Preliminary Investigations on the Distribution of *Leptospira* Serovars in Domestic Animals in North-west Morocco. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 63, n. 2, p. e178–e184, 26 jul. 2014.
- BRADLEY, E. A.; LOCKABY, G. Leptospirosis and the Environment: A Review and Future Directions. **Pathogens**, v. 12, n. 9, p. 1167, 1 set. 2023.
- BROUX, B; TORFS, S; WEGGE, B; DEPREZ, P; LOON, G. V. Acute Respiratory Failure Caused by *Leptospira* spp. in 5 Foals. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 26, n. 3, p. 684–687, 2012
- CÂMARA, R. J. F; BUENO, B. L; RESENDE, C. F; BALASURIYA, U. B. R; SAKAMOTO, S. M; REIS, J. K. P. Viral Diseases that Affect Donkeys and Mules. **Animals**, v. 10, n. 12, p. 2203, 25 nov. 2020.
- CHIANI, Y. T; JACOB, P; MAYORA, G; AQUINO, D. S; QUINTANA, R. D; MESA, L. Presence of *Leptospira* spp. in a Mosaic of Wetlands Used for Livestock Raising under Differing Hydroclimatic Conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 89, n. 6, 28 jun. 2023.
- CILIA, G; BERTELLONI, F; ALBINI, S; FRATINI, F. Insight into the Epidemiology of Leptospirosis: A Review of *Leptospira* Isolations from “Unconventional” Hosts. **Animals**, v. 11, n. 1, p. 191, 14 jan. 2021.
- DADDY, K. K; MWANZA, M; OGUTTU, J. W; NGOMA, L. The prevalence and risk factors associated with *Leptospira* in donkeys in Ngaka Modiri Molema District, North West Province, South Africa. **Veterinary World**, v. 13, n. 9, p. 2020–2027, 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.
- DI AZEVEDO, M. I. N.; LILENBAUM, W. Equine genital leptospirosis: Evidence of an important silent crônica reproductive syndrome. **Theriogenology**, v. 192, p. 81–88. 2022.
- DI AZEVEDO, M. I. N; AYMÉE, L; BORGES, A. L. S. B; LILENBAUM, W. Molecular Epidemiology of Pathogenic *Leptospira* spp. Infecting Dogs in Latin America. **Animals**, v. 13, n. 15, p. 2422, 1 jan. 2023.

DÍAZ, E. A; ARROYO, G; SÁENZ, C; MENA, L; BARREGÁN, V. Leptospirosis in horses: Sentinels for a neglected zoonosis? A systematic review. **Veterinary World**, p. 2110–2119, 1 out. 2023.

DIVERS, T. J. Acute Kidney Injury and Renal Failure in Horses. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 38, n. 1, p. 13–24. 2022.

ELLIS, W. A. Animal Leptospirosis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 387, p. 99–137, 12 nov. 2014.

FILHO, R. B. O; MALTA, K. C; OLIVEIRA, J. M. B; SANTANA, V. L. A; HARROP, M. H. V; STIPP, D. T; JÚNIOR, J. W. P. Epidemiological Analysis of *Leptospira* spp. Infection in Equids from the Brejo Paraibano Microregion of Brazil. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, n. 3, p. 407–414, mar. 2014.

FURQUIM, M. E. C; SANTOS, R. F; MATHIAS, L. A. Antibodies against *Leptospira* spp. in bovine serum samples from several Brazilian states analyzed in the period from 2007 to 2015. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 73, n. 2, p. 277–284, mar. 2021.

GALVÃO, C. M. M. Q; RIBEIRO-ANDRADE, M; COSTA, D. F; SAMICO-FERNANDES, E. F. T; PORTO, W. J. N; ALVES, C. J; MOTA, R. A. et al. Prevalence of anti-*Leptospira* spp. antibodies among donkeys in the semi-arid northeastern region of Brazil. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 11, p. e400111133655–e400111133655, 26 ago. 2022.

GAMEIRO, M. B. P; REZENDE, V. T; ZANELLA A. J. Brazilian donkey slaughter and exports from 2002 to 2019. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 58, p. e174697–e174697, 20 abr. 2021.

GILGER, B. C.; DEGROOTE, R. L.; DEEG, C. A. Diseases of the Uvea, Uveitis, and Recurrent Uveitis. p. 441–498. 2022

GREVEMEYER, B; VANDENPLAS, M; BEIGEL, B; CHO, E. WILLINGHAM, A. L; VERMA, A. Detection of Leptospiral DNA in the Urine of Donkeys on the Caribbean Island of Saint Kitts. **Veterinary Sciences**, v. 4, n. 4, p. 2, 10 jan. 2017.

GRILLOVÁ, L; ANGERMEIER, H; LEVY, M; GIARD, M; LASTÈRE; PICARDEAU. Circulating genotypes of *Leptospira* in French Polynesia An 9-year molecular epidemiology surveillance follow-up study. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 9, p. e0008662. 2020

- GUERNIER, V; ALLAN, K. J; GOARANT, C. Advances and challenges in barcoding pathogenic and environmental *Leptospira*. **Parasitology**, v. 145, n. 5, p. 595–607, 18 jul. 2017.
- HAGGAG, Y. N; SAMAHA, H. A; NOSSAIR, M. A; EL-SHAFII, S. S. A; ABDALLA, S. T. A. Seroprevalence of *Leptospira* Hardjo in Equine and Human in Behera Province, Egypt. **alexandria journal of veterinary sciences**, v. 47, n. 1, p. 113–113, 1 jan. 2015.
- HAMOND, C; PESTANA, C. P; SOUZA, C. M. R; CUNHA, L. E. R; BRANDÃO, F. Z; MEDEIROS, M. A; LILENBAUM, W. Presence of leptospires on genital tract of mares with reproductive problems. **Veterinary Microbiology**, v. 179, n. 3-4, p. 264–269. 2015
- HASSANPOUR, A; SAEID, SAFARMASHAEI. Seroprevalence of leptospiral infection in horses, donkeys and mules in East Azerbaijan province. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 20, 30 maio 2012.
- JARA, M; ESCOBAR, L. E; RODRIGES, R. O; FRIAS-DE-DIEGO; A; SANHUEZA, J; MACHADO, G. Spatial distribution and spread potential of sixteen *Leptospira* serovars in a subtropical region of Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 66, n. 6, p. 2482–2495, 17 ago. 2019.
- 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, 2 jan. 2020.
- LARA, M. C. C. S. H; VILLALOBOS, E. M. C; CUNHA, E. M. S; OLIVEIRA, J. V; CASTRO, V; NASSAR, A. F. C; SILVA, L. M. P; OKUDA, L. H; ROMALDINI, A. H. C. N; CUNHA, M. S; MARQUES, E. C; MORI, E. Ocorrência de anticorpos contra *Leptospira* spp. em asininos no estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 86, p. e0582018, 15 ago. 2019.
- LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 296–326, 1 abr. 2001.
- LOPES, I; MELO, J. M. M; MONTENEGRO, A. A. A; GUIMARÃES, J. M; LOPES, B; LEAL, B. G. Caracterização pluviométrica, precipitações máximas e balanço hídrico para diferentes regimes pluviométricos em mesorregiões de Pernambuco. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, v. 7, n. 3, p. 020-033, 29 dez. 2017.
- LOUREIRO, A. P.; LILENBAUM, W. Genital bovine leptospirosis: A new look for an old disease. **Theriogenology**, v. 141, p. 41–47, jan. 2020.

Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres. **Leptospirose**, Capítulo 3.1.12.—Leptospirose 1; páginas 1–13. 2021

MARIANA RAMOS QUEIROZ; BOMBO, M.; ADROALDO JOSÉ ZANELLA. The population of donkeys and mules in Brazil according to agricultural censuses from 1960 to 2017. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 58, p. e174365–e174365, 1 abr. 2021.

MARTIN, L. E. R; WIGGANS, S. A; WENNOGLE, K; CURTIS, R; CHANDRASHEKAR, R; LAPPIN, M. R. Vaccine-Associated *Leptospira* Antibodies in Client-Owned Dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 28, n. 3, p. 789–792, 5 mar. 2014.

MORAIS, D. A; COSTA, D. F; NUNES, B. C; SANTOS, C. C. A. B; ALVES, C. J; AZEVEDO, S. S. Seroepidemiological survey for leptospirosis in equines from semiarid region of Paraíba state, Northeastern Brazil. **Semina-Ciências Agrárias**, v. 40, n. 5, p. 2079–2079, 4 jul. 2019.

MORAIS, D. A; JÚNIOR, D. A. S; NUNES, B. C; COSTA, D. F; VIANA, M. P; SILVA, J. D; HIGINO, S. S. S; AZEVEDO, S. S; ALVES, C. J. Leptospirosis in donkeys (*Equus asinus*) destined for slaughter and export. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 40, n. 6Supl3, p. 3541, 16 out. 2019.

MORAIS, D. A; NUNES, B. C; SOARES, R. R; OLIVEIRIA, M. D; COSTA, D. F; ARAÚJO, H. G; JÚNIOR, J. P. A; MALOSSI, C. D; SILVA, M. L. C. R; AZEVEDO, S. S; ALVES, C. J. Strong Evidence of the Role of Donkeys in the Epidemiology of *Leptospira* spp. in Semiarid Conditions. **Microorganisms**, v. 11, n. 7, p. 1853, 2023.

NGETICH, W.; CHEPKIRUI, E. A review of zoonotic pathogens of donkeys (*Equus asinus*). **Journal of Animal Science and Veterinary Medicine**, v. 5, n. 1, p. 9130–9131, 2020.

NORRIS, S. L; LITTLE, A. H; RYDING, J; RAW, Z. Global donkey and mule populations: Figures and trends. **PLOS ONE**, v. 16, n. 2, p. e0247830, 25 fev. 2021.

PIREDDA, I; BERTOLDI, L; CHISU, V. Genome Sequence of a *Leptospira montravelensis* Strain Isolated from Donkey Urine during a Leptospirosis Outbreak in Sardinia Island, Italy. **Microbiology Resource Announcements**, v. 12, n. 1, p. e0100922, 24 jan. 2023.

PIREDDA, I; BERTOLDI, L; PEDDITZI, A; PINTORE, P; PALMAS, B; CHISU, V. Co-Infection by *Leptospira montravelensis* and *Leptospira interrogans* Serovar Pomona in Urine Samples of Donkeys and Pigs in Sardinia, Italy. **Animals**, v. 13, n. 11, p. 1803, 1 jan. 2023.

PIRES, B; SANTOS, J. B. F; SANTOS, J. P. A. F; SILVA, D. M; REIS, T. F. M; CUCCATO, L. P; CLUFFA, A. Z; REZENDE, L. M; RIBEIRO, R. A. C; LIMA, A. M. C. Occurrence of serological reactions for *Leptospira* spp. in donkeys and mules from Minas Gerais, Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 55, n. 4, 3 jul. 2023.

QUEIROZ, M. R; BOMBO, M.; ZANELLA, A. J. The population of donkeys and mules in Brazil according to agricultural censuses from 1960 to 2017. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 58, p. e174365–e174365, 1 abr. 2021.

ROMANOWSKI, T. N. A; DIAS, R. A; HEINEMANN, M. B; CARVALHO, S. F; SILVA, T. A; MARTINS, A. S; CAETANO, G. D. C; JÚNIOR, Á. F; SANTOS, J. P; BORSANELLI, A. C. Seroprevalence of Equine Leptospirosis in the State of Goiás, Brazil. **Veterinary Sciences**, v. 10, n. 10, p. 590–590, 25 set. 2023.

ROQUEPLO, C; KODJO, A; DEMONCHEAUX, J-P; DIATTA, G; SOKHNA, C; RAOULT, D; DAVOUST, B; MEDIANNIKOV, O. Leptospirosis, one neglected disease in rural Senegal. **Veterinary medicine and science**, v. 5, n. 4, p. 536–544, 25 jul. 2019.

SAMIR, A; SOLIMAN, R; EL-HARIRI, M; ABDEL-MOEIM, K; HATEM, M. E. Leptospirosis in animals and human contacts in Egypt: broad range surveillance. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 3, p. 272–277, jun. 2015.

SOHM, C; STEINER, J; JÖBSTL; WITTEK, T; FIRTH, C; STEINPARZER, R; DESVARS-LARRIVE, A. A systematic review on leptospirosis in cattle: A European perspective. **One Health**, v. 17, p. 100608–100608, 1 dez. 2023.

STANKEVIČIENĖ, M; BUITKUVIENĖ, J; BARTAŠEVIČIŪTĖ, N; ADOMKIENĖ, R; STATKEVIČIŪTĖ, J. Seroepizootic Survey Of Leptospirosis In Horses. **Veterinarija Ir Zootechnika**, v. 64, n. 96, p. 64-68, 2016.

STEINPARZER, R; MAIR, R; UNTERWEGER, C; STEINRIGL, A; SCHAMOLL, F. Influence of Selective Agents (EMJH-STAFF), Sample Filtration and pH on *Leptospira interrogans* Serovar Icterohaemorrhagiae Cultivation and Isolation from Swine Urine. **Veterinary Sciences**, v. 8, n. 6, p. 90–90, 25 maio 2021.

STODDARD, R. A; NOSSA, 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.

STRAND, T. M; ENGVALL, E. O; LAHTI, E; HJERTQVIST, M; LUNDKVIST. Leptospira Status in Sweden during the Past Century, Neglected and Re-Emerging? **Microorganisms**, v. 11, n. 8, p. 1991–1991, 2 ago. 2023.

TORTORA, G. J; CASE, C. L; FUNKE, B. R. Crescimento Microbiano. In: **Microbiologia**, 12ª edição. Porto Alegre: ARTMED, 2016. p. 156-182

WASFY, S. A. F. M. O; EL-TRAS, W. F, SAMIR, A; RAHAMAN, B. A; BOSHRA, PARKER, T. M; HATEM, M. E; EL-BASSIOUNY, A. A; MURRAY, C. K; PIMENTAL, G. Cross-Species Surveillance of Leptospira in Domestic and Peri-Domestic Animals in Mahalla City, Gharbeya Governorate, Egypt. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 3, p. 420–425, 4 mar. 2011.