

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Mariane Pacheco Bastiani

**FATORES ASSOCIADOS À LEPTOSPIROSE EM EQUINOS
DE CONTINGENTE MILITAR NO ESTADO DO RIO
GRANDE DO SUL**

Santa Maria, RS
2020

Mariane Pacheco Bastiani

**FATORES ASSOCIADOS À LEPTOSPIROSE EM EQUINOS DE CONTINGENTE
MILITAR NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Sanidade e Reprodução Animal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Orientadora: Prof^{ta}. Dr^a. Sônia de Avila Botton

Santa Maria, RS
2020

Mariane Pacheco Bastiani

**FATORES ASSOCIADOS À LEPTOSPIROSE EM EQUINOS DE CONTINGENTE
MILITAR NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Sanidade e Reprodução Animal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Aprovada em 17 de janeiro de 2020

Sônia de Avila Botton, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Ana Eucares Von Laer, Dr^a. (UFSM)

Rogério Oliveira Rodrigues, Dr. (IPVDF)

Santa Maria, RS
2020

DEDICATÓRIA

*Com gratidão, dedico a Deus, que me alimentas com fé e energia vital para nunca desistir
diante das dificuldades.*

“Entrego, confio, aceito e agradeço!”

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária por me proporcionar conhecimento e formação acadêmica.

À equipe do Laboratório de Diagnóstico e Pesquisa em Leptospirose (LABLEPTO) pela amizade e aprendizagem, permitindo que eu pudesse crescer pessoal e profissionalmente. Agradeço especialmente às professoras Ana Eucares von Laer e Luciane Teresinha Lovato, bem como a médica veterinária Neite Machado Pereira pela paciência e dedicação ao me ensinar as técnicas laboratoriais.

À minha orientadora, Sônia de Avila Botton, sempre disposta e dedicada, peça essencial e indispensável nesse estudo. Ao meu co-orientador, Luís Antônio Sangioni o qual, carinhosamente, me direcionou para esta caminhada.

Aos colaboradores do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), que me acolheram com muita atenção e carinho.

Ao Exército Brasileiro, em especial, ao Coronel Francisco Costa Neto e aos veterinários que tornaram essa pesquisa possível.

Aos amigos e familiares que sempre me apoiaram nos momentos alegres e difíceis.

A todos os demais que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho e que participaram desta etapa da minha vida que muito me ensinou e fortaleceu.

Gratidão!

RESUMO

Fatores associados à leptospirose em equinos de contingente militar no estado do Rio Grande do Sul

AUTOR: Mariane Pacheco Bastiani

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Sônia de Avila Botton

A leptospirose é uma das zoonoses mais difundidas no mundo, especialmente em países em desenvolvimento, onde representa um problema de saúde pública. As bactérias do gênero *Leptospira* podem infectar uma ampla variedade de espécies, as quais podem agir como reservatórios e/ou portadores renais quando cronicamente infectadas, excretando as bactérias através da urina. A leptospirose em equinos é, geralmente, assintomática, podendo estar associada à uveíte recidivante, abortos, natimortalidade e infecção neonatal. Os objetivos deste estudo foram determinar a ocorrência de *Leptospira* spp. e verificar os fatores associados à infecção em equinos provenientes de um contingente militar do estado do Rio Grande do Sul. Um total de 446 animais foram avaliados, alocados nas seguintes categorias: 309 matrizes (com histórico de abortos), 11 garanhões e 126 animais alocados na categoria com idade média de 3 anos. Para determinação da ocorrência da população, foi empregada a técnica de soroaglutinação microscópica, bem como foram implementados questionários para investigação dos fatores de risco presentes no local, onde os animais estavam expostos. A ocorrência de leptospirose foi de 54,48% (243/446) na população total. As soroprevalências na população de animais com média de 3 anos de idade, nas matrizes e nos garanhões foram de 57,94% (73/126), 54,05% (165/309) e 45,45% (5/11), respectivamente. Em todas as categorias o sorovar predominante foi Ballum seguido de Icterohaemorrhagiae, exceto nos garanhões que foi seguido de Tarassovi. Os principais fatores ambientais associados à infecção foram o contato com diversas fontes de água, presença de roedores e contato com animais silvestres e domésticos. A elevada ocorrência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. pode estar associada à presença de fatores de risco, portanto a exposição dos animais aos possíveis reservatórios da infecção deve ser minimizada, assim como uma reavaliação do protocolo de profilaxia, possivelmente, através da adoção de um menor intervalo entre as vacinações.

Palavras-chave: *Leptospira* spp., zoonose, soroprevalência, reservatórios, equinos.

ABSTRACT

Factors associated to leptospirosis in military contingent horses in the state of Rio Grande do Sul, Brazil

AUTHOR: Mariane Pacheco Bastiani

ADVISOR: Sônia de Avila Botton

Leptospirosis is one of the most widespread zoonoses in the world; especially in developing countries representing a public health problem. The etiological agent, the bacteria *Leptospira* can infect a wide variety of species, which can act as reservoirs and / or renal carriers when chronically infected, excreting the bacteria through the urine. Leptospirosis in horses is usually asymptomatic and may be associated with recurrent uveitis, abortion, stillbirth and neonatal infection. The objectives of this study were to determine the occurrence of *Leptospira* spp. and to verify the factors associated to leptospirosis in horses from a military contingent of the state of Rio Grande do Sul. A total of 446 horses were evaluated and categorized into 309 mares (with an abortion history), 11 stallions, and 126 horses with an average age of 3 years. The microscopic serum agglutination technique was used to determine the seroprevalence of the population, and questionnaires were implemented to investigate the main factors linked to the infection present at the site to which the animals were exposed. The occurrence of anti-*Leptospira* spp. agglutinins was 54.48% (243/446) in the studied population. In the horses with an average age of 3 years, mares, and stallions the occurrence was 57.94% (73/126), 54.05% (165/309), and 45.45% (5/11), respectively. In all categories, the predominant serovar was Ballum followed by Icterohaemorrhagiae; however, in the stallions, the second most prevalent serovar was Tarassovi. The main ambient factors were contact with different water sources, presence of rodents, and contact with wild and domestic animals. The high occurrence of anti-*Leptospira* spp. antibodies may be associated with the presence of these main factors. Therefore, the exposure of horses to possible reservoirs of *Leptospira* spp. should be minimized. Moreover, the immunoprophylaxis protocol should be reviewed and a shorter interval between vaccinations should be adopted to control leptospirosis, whose economic impact should be evaluated in horse populations.

Keywords: *Leptospira* spp., zoonosis, seroprevalence, reservoirs, horses.

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

| | |
|---|----|
| Table 1 - Occurrence of <i>Leptospira</i> spp. evaluated in the military horse categories included in the study..... | 34 |
| Table 2 - Factors associated to the leptospirosis obtained by the application of questionnaires to the equine herd included in the study, according to the different categories of horses | 35 |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 10 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA..... | 11 |
| 2.1 AGENTE ETIOLÓGICO, EPIDEMIOLOGIA E CONTROLE DA LEPTOSPIROSE.... | 11 |
| 2.2 LEPTOSPIROSE EQUINA..... | 13 |
| 2.3 DIAGNÓSTICO DE LEPTOSPIROSE..... | 14 |
| 2.4 LEPTOSPIROSE- PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA..... | 16 |
| 3 CAPITULO 1..... | 19 |
| 3.1 ABSTRACT..... | 21 |
| 3.2 INTRODUCTION..... | 22 |
| 3.3 MATERIAL AND METHODS..... | 23 |
| 3.4 RESULTS AND DISCUSSION | 24 |
| 3.5 CONCLUSION..... | 28 |
| 4 CONCLUSÃO | 37 |
| 5 REFERÊNCIAS..... | 38 |
| 6 ANEXOS..... | 42 |

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é um problema de saúde pública mundial por ser uma das zoonoses mais difundidas. É uma doença emergente que infecta uma ampla variedade de hospedeiros, como peixes, répteis, aves, marsupiais e mamíferos (GOMES-SOLECKI; SANTECCHIA; WERTS, 2017). Trata-se de uma enfermidade ocasionada por bactérias do gênero *Leptospira*, transmitida principalmente pela urina de roedores, em ambientes rurais e urbanos. Ocorre principalmente em áreas urbanas de países em desenvolvimento bem como em regiões rurais de todo o mundo (BHARTI et al., 2003; PEREIRA, 2014).

As espécies animais domésticas são suscetíveis à infecção pelos diferentes sorovares de *Leptospira* spp. Dentre as espécies de produção, destaca-se os equinos, uma vez que o Brasil possui o terceiro maior rebanho de equinos do mundo e o maior da América Latina (MAPA, 2014). A população equina no estado do Rio Grande do Sul (RS) é estimada em 468.691 cabeças (IBGE, 2014). As criações de equinos geram mais de US \$ 7,3 bilhões em atividades econômicas anualmente. Adicionalmente, a indústria equina no Brasil, especialmente no RS, é uma relevante atividade agrícola que combina negócios, esporte e lazer e envolve milhões de pessoas (ALMEIDA; SILVA, 2010). Nas unidades militares o equino tem sido empregado para segurança, esporte, lazer, mantendo polos de reprodução e manutenção destes animais. O objetivo deste tipo de criação tem função agregadora e na formação e atuação de profissionais da equitação (CAMILO, 2017). Neste sentido, o conhecimento das principais enfermidades que acometem os equinos é fundamental para determinar sua importância econômica e o manejo sanitário adequado aos rebanhos.

Tendo em vista que a leptospirose é uma doença, na maioria das vezes, subclínica em equinos, as consequências aparecem subitamente, ou seja, quando suspeita-se de leptospirose a infecção já está disseminada em um expressivo número de animais. Além de causar a enfermidade em equinos, deve-se enfatizar o potencial zoonótico deste micro-organismo, podendo intervir na saúde dos trabalhadores e colaboradores. O diagnóstico definitivo da leptospirose auxilia no manejo do plantel, através do reconhecimento do problema e emprego de tratamento específico, bem como na implementação de medidas adequadas de controle e profilaxia da infecção (FAINE et al. 1999; CASELANI et al., 2012).

Diante do exposto, os objetivos deste estudo foram determinar a ocorrência de *Leptospira* spp. e verificar os fatores associados à infecção em equinos provenientes de um contingente militar do estado do Rio Grande do Sul.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AGENTE ETIOLÓGICO, EPIDEMIOLOGIA E CONTROLE DA LEPTOSPIROSE

O agente da leptospirose é uma bactéria Gram negativa, denominada *Leptospira* spp., com formato helicoidal (espiroqueta) e aeróbica obrigatória (PEREIRA, 2014; BRASIL, 2017). Existem aproximadamente, 20 espécies reconhecidas do gênero *Leptospira* que estão subdivididas em sorogrupos e sorovares, de acordo com as suas diferenças antigênicas (FERREIRA; COSTA; PEREIRA, 2014). Atualmente, são identificados mais de 24 sorogrupos e mais de 250 sorovares, tendo como base a expressão do lipopolissacarídeo (LPS) exposto na superfície (GOMES, 2015; BHARTI et al., 2003). Cada sorovar possui seu(s) hospedeiro(s) preferencial(ais), entretanto, uma mesma espécie animal hospedeira pode albergar um ou mais sorovares (BRASIL, 2017).

Animais infectados podem se tornar portadores por longos períodos de tempo e excretar o micro-organismo na urina, contaminando o meio ambiente, principalmente solo e água (ELLIS, 2015; GOMES-SOLECKI; SANTECCHIA; WERTS, 2017). Um amplo espectro de animais sinantrópicos, domésticos e selvagens, servem como reservatórios para a persistência de focos de infecção por esse agente. No meio urbano, os principais reservatórios são os roedores, especialmente as ratazanas (*Rattus norvegicus*), os ratos de telhado (*Rattus rattus*) e os camundongos (*Mus musculus*), que são cronicamente infectados e assintomáticos. Contudo, outros animais domésticos foram identificados como reservatórios da bactéria, incluindo os suínos, os bovinos, os equinos, os pequenos ruminantes e os cães (BRASIL, 2014; GOMES-SOLECKI; SANTECCHIA; WERTS, 2017).

Desta forma, ressalta-se que a infecção por *Leptospira* spp. ocorre, na maioria das vezes, de maneira indireta, através do contato com água ou solo úmido contaminado e subsequente penetração da bactéria na pele e mucosas intactas ou lesionadas dos indivíduos (FERREIRA; COSTA; PEREIRA, 2014; GOMES-SOLECKI; SANTECCHIA; WERTS, 2017).

Os principais fatores de risco para a infecção por *Leptospira* spp. são aqueles que expõem o indivíduo suscetível ao hospedeiro infectado ou ao ambiente contaminado (VIJAYACHARI; SUGUNAN; SHRIRAM, 2008). Sendo assim, os fatores de risco para a leptospirose estão associadas as estações do ano chuvosas e as inundações, pois propiciam a disseminação e a persistência das bactérias no ambiente e também predispõem o contato do

indivíduo com águas contaminadas, promovendo a ocorrência de surtos (BRASIL, 2014; OIE, 2014; BRASIL, 2017).

Os sorovares mais frequentes nos diferentes estados brasileiros por espécie animal doméstica, incluem em ovinos *Icterohaemorrhagiae*; nos bubalinos Hardjo e Wolff; em cães Copenhageni, *Icterohaemorrhagiae* e *Pyrogenes* (FAVERO et al., 2002) e nos equinos *Icterohaemorrhagiae* (LILENBAUM, 1998; FAVERO et al., 2002) *Grippotyphosa*, *Pyrogenes* (FAVERO et al., 2002), Bratislava, Pomona (LILENBAUM, 1998; THOMASSIAN, 2005), Hardjo e *Canicola* (THOMASSIAN, 2005).

A patogenia da leptospirose em animais é complexa e está relacionada a múltiplos fatores tais como, localização do patógeno, adaptabilidade ao hospedeiro e aporte imunológico (PINNA et al., 2010). A infecção por *Leptospira* spp. é uma importante causa de aborto e natimortalidade nas diferentes espécies de produção, como os pequenos ruminantes (HIGINO; AZEVEDO, 2014), os bovinos (ROLIM et al., 2012) e os suínos (FIGUEIREDO et al., 2013). Nos cães, a patogenia pode ser de evolução muitas vezes fatal, caracterizada pelo comprometimento hepático e renal, resultando em icterícia e insuficiência renal aguda ou crônica (HAGIWARA; LUSTOSA; KOGIKA, 2004).

Para o controle da infecção nos animais, deve-se combater roedores em depósitos de ração, evitar contaminação de água e alimentos a serem consumidos, evitar a aglomeração de indivíduos, além do emprego de vacinas (BARROS; MOTA; LIMA, 2013). Poucos são os programas de controle de leptospirose que enfatizam a adoção do controle ambiental associado à tradicional combinação de vacinação e uso de antimicrobianos. No entanto, algumas práticas de manejo e o ambiente influenciam na transmissão da infecção em diversas espécies (PINNA; VARGES; LILENBAUM, 2008).

As vacinas disponíveis comercialmente para prevenção da leptospirose na medicina veterinária são bacterinas que consistem na célula inteira da bactéria inativada por calor ou formalina (OLIVEIRA, 2014). A vacinação animal é realizada como medida de prevenção da enfermidade; entretanto, a proteção conferida pelas vacinas comerciais é limitada e não evita a condição de portador (FELIX, 2013). As limitações da vacina podem ser explicadas, provavelmente, por se basearem em uso de lipopolissacarídeos específicos de um único sorovar (ROCHA et al., 2004), levando-se em consideração que já foram identificados mais de 250 sorovares de *Leptospira* spp. (RIEDIGER, 2012). Ressalta-se que há uma discrepância na soroconversão quando do uso de vacinas multivalentes. Embora a vacina possa estimular uma resposta significativa e rápida na produção de anticorpos, esta resposta é de curta duração (MARTINS et al., 2017).

2.2 LEPTOSPIROSE EQUINA

Os sorotipos mais prevalentes nas infecções em equinos são Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa, Pyrogenes, Bratislava, Pomona, Hardjo e Canicola (LILENBAUM, 1998; FAVERO et al., 2002; THOMASSIAN, 2005). O agente etiológico pode ser transmitido aos equinos por portadores como ratos, suínos, bovinos, gambás, preás, raposas, morcegos e outros animais infectados que podem contaminar a água e os alimentos destinados ao consumo dos animais (THOMASSIAN, 2005).

De acordo com Bolin (1996), os sorovares de *Leptospira* spp. presentes em uma determinada região estão associados à presença de um ou mais hospedeiros de manutenção, que servem como reservatórios naturais da infecção. A disseminação deste agente é caracterizada principalmente pela presença de animais doentes ou portadores assintomáticos que eliminam a bactéria pela urina, descargas cérvico-vaginais, fetos abortados e placenta, mantendo a doença endêmica na propriedade (FAINE et al. 1999). Além disso, ocorrência da leptospirose também está associada à ausência de manejo sanitário adequado (CASELANI et al., 2012).

A infecção por *Leptospira* spp. em equinos, na maioria dos casos, é assintomática, mas, ocasionalmente, causa diversos quadros clínicos. A leptospirose clínica está primariamente associada à uveíte redicivante, abortos, parto de natimortos e infecções neonatais (RIET-CORREA et al., 2001; BERTONE; BROWN, 2002). Os abortos podem ocorrer após o terceiro mês de gestação, contudo são mais frequentes após o sexto mês. Ocorrem, também, natimortos e nascimento de potros fracos que morrem nos primeiros dias de vida (RIET-CORREA et al., 2001). A gravidade das manifestações clínicas depende não somente da dose e da virulência do sorovar infectante, como também da suscetibilidade do hospedeiro e dos órgãos e sistemas atingidos (ANZAI, 2006).

A leptospirose em equinos, a partir da fase aguda da doença, perdura por um período superior a 10 semanas na maioria dos cavalos, sugerindo que estes animais possam servir como importante reservatório para transmissão da infecção (ROMERO et al., 1994; ELLIS, 2015). O crescente número de equinos soropositivos para *Leptospira* spp. demonstra a importância da leptospirose nesta espécie em termos econômicos, da saúde animal e representa risco à saúde pública (PIRES NETO; HESSE; OLIVEIRA, 2005). Por se tratar de uma zoonose e mesmo que não existam relatos de casos de leptospirose humana transmitida por equinos, conhecer os aspectos clínicos e epidemiológicos nas diferentes espécies visa

minimizar os riscos de transmissão desta doença para os seres humanos, bem como animais de companhia (PIRES NETO; HESSE; OLIVEIRA, 2005; BRASIL 2014; BRASIL 2017).

Contudo, profilaticamente deve-se evitar a contaminação de água e alimentos a serem consumidos pelos equinos, principalmente com a urina dos animais transmissores da infecção e combater exaustivamente os roedores nos depósitos de alimentos (grãos e rações dos animais) (THOMASSIAN, 2005). Entre as medidas sanitárias e higiênicas se inclui evitar a exposição às águas paradas e aos hospedeiros transmissores em potencial (roedores, animais silvestres, domésticos, incluindo as espécies de produção como os bovinos e os suínos). Adicionalmente, proporcionar o isolamento de animais infectados e a desinfecção dos locais onde animais doentes ou suspeitos estavam alojados (TROEDSON, 2003).

Segundo Sena et al. (2016), a infecção por Herpesvírus equino tipo I e leptospirose são as causas infectocontagiosas mais comuns de aborto em éguas, tornando imprescindível o controle sanitário e a vacinação do plantel. A vacinação de equinos contra a leptospirose pode desencadear uma resposta humoral difícil de diferenciar da resposta por infecção natural (HINES, 2007). Ainda, existem poucos relatos científicos sobre a resposta humoral pós-vacinal induzida pela vacina e, também, há uma escassez de informações sobre a dinâmica da resposta imunológica em animais naturalmente infectados por *Leptospira* spp. (MARTINS et al., 2017).

De acordo com Martins et al. (2017) há uma conversão sorológica significativa após vacinação, contra quase todas as cepas inclusas na vacina. Todavia, as respostas são bastante variadas e mais pronunciadas contra os antígenos circulantes no plantel. Esta discrepância na soroconversão representa grande limitação na utilização de vacinas multivalentes, porque o número de antígenos pode desencadear diferentes graus de resposta imunológica. Apesar da vacina provocar resposta humoral significativa e rápida em equinos, a resposta induzida apresenta curta duração, sendo detectada até 60 a 90 dias pós-vacinação.

2.3 DIAGNÓSTICO DE LEPTOSPIROSE

O diagnóstico laboratorial da leptospirose é essencialmente o mesmo na medicina humana e veterinária. As amostras biológicas mais comumente utilizadas incluem o soro, o sangue total e o líquido cefalorraquidiano (líquor) (RIEDIGER, 2012). As técnicas de diagnóstico laboratorial são fundamentadas na detecção direta ou indireta do agente ou do material genético (ANZAI, 2006). Entre os testes específicos realizados para confirmação da leptospirose, destacam-se o isolamento do micro-organismo pela cultura microbiológica, os

testes moleculares e a pesquisa de anticorpos pelas provas sorológicas (FAINE et al., 1999; ELLIS, 2015).

O método de diagnóstico preferencial tem sido baseado principalmente na pesquisa indireta do agente, baseando-se na presença de anticorpos no soro de indivíduos infectados. O isolamento e a identificação de *Leptospira* spp. pelos métodos culturais e bioquímicos são fastidiosos e, portanto, não são viáveis. Isto é explicado pelo fato de que a bactéria apresenta um período de crescimento longo e não reage com os substratos comumente usados para a identificação de outras bactérias (FAINE et al., 1999; OIE, 2014; ELLIS, 2015), inviabilizando o uso do cultivo como método diagnóstico de triagem por possuir baixa sensibilidade (RIEDIGER, 2012). Entretanto, a sorologia apresenta três questões principais que podem interferir no resultado: a amostragem, o painel de antígenos empregado e o ponto de corte utilizado (PINTO; LIBONATI; LILENBAUM, 2017)

A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera o teste de soroglutinação microscópica (SAM) com antígenos vivos como padrão ouro para o diagnóstico da leptospirose (WHO, 2003). A SAM consiste na reação do soro do paciente com diluições seriadas de um painel de culturas de diferentes sorovares de *Leptospira* spp. Esta técnica é capaz de detectar a presença de anticorpos, determinando o título e a especificidade, uma vez que detecta o sorogrupo dos anticorpos IgM e IgG presentes no soro do paciente frente aos sorovares avaliados no teste (RIEDIGER, 2012; OIE, 2014). Todavia, alguns problemas podem ocorrer, incluindo: a existência de reações cruzadas entre os sorovares, a não distinção entre os títulos vacinais e a dificuldade de distinção do início da fase aguda da enfermidade. Estes são fatores importantes na interpretação dos resultados laboratoriais, sendo assim, os testes sorológicos devem ser realizados levando em consideração dados epidemiológicos, bem como as informações obtidas na anamnese e no exame físico (BOLIN, 1996).

Na SAM são consideradas reagentes as amostras que apresentem título igual ou superior a 100, com 50% de aglutinação ou com o desaparecimento das células bacterianas. Esta reação é observada em microscopia de campo escuro (BRASIL, 1995; OIE, 2014). A interpretação dos resultados deste teste é foco de muita discussão, embora um título de anticorpos de 100 seja internacionalmente aceito como suficiente para considerar um animal positivo. Os animais domésticos que apresentam um título maior ou igual a 100 associado à presença de manifestações clínicas têm sido usado como um indicador de leptospirose (ELLIS, 2015). A recomendação é que as amostras de soro devem ser testadas de forma pareada, sendo coletadas com um intervalo de pelo menos 15 dias (OIE, 2014).

Na primeira semana de doença (fase septicêmica) pode ser realizada a cultura do sangue e líquido para o isolamento do agente. A detecção do material genético bacteriano pode ser efetuada por reação em cadeia da polimerase (PCR). Nesta fase a sorologia pode surtir resultado negativo ou os títulos baixos serem indetectáveis (FERREIRA; COSTA; PEREIRA, 2008).

A análise de DNA utilizando amplificação de genes pela PCR permite um diagnóstico precoce e rápido da doença (FIOCRUZ, 2005; PIRES NETO; HESSE; OLIVEIRA, 2005), ainda na fase leptospirêmica/septicêmica, antes do aparecimento dos anticorpos (FERREIRA; COSTA; PEREIRA, 2008). Uma variedade de *primers* para realização da PCR tem sido descrita, com alguns deles identificando somente o gênero *Leptospira* e outros distinguindo apenas as espécies patogênicas. Entretanto, a maioria dos testes de PCR disponíveis ainda não foram capazes de identificar o sorovar infectante (OIE, 2014). Contudo, Cai et al. (2010) identificaram seis genes responsáveis pela expressão proteica do antígeno bacteriano que são capazes de discernir alguns sorogrupos e indicaram que a tipagem, baseada em DNA, pode ser um método confiável para ser empregado nos estudos epidemiológicos. No entanto, mais estudos envolvendo os métodos moleculares devem ser realizados para a auxiliar na identificação diferencial de *Leptospira* spp.

2.4 LEPTOSPIROSE – PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA NO BRASIL

A leptospirose tem distribuição cosmopolita; entretanto, no Brasil, é uma doença endêmica e torna-se epidêmica em períodos chuvosos, acometendo, principalmente, os seres humanos que possuem condições precárias de moradia e trabalho, especialmente os indivíduos que não possuem saneamento básico (FERREIRA; COSTA; PEREIRA, 2014; BRASIL, 2017).

Esta enfermidade gera grandes custos no sistema de saúde pública, prejudicando, além da saúde dos trabalhadores, a redução dos dias de trabalho produtivo dos servidores doentes e acarretando gastos com internações hospitalares (PEREIRA, 2014). Portanto, ressalta-se que a leptospirose é um importante problema de saúde pública no Brasil e em outros países em desenvolvimento. Nestes locais, a enfermidade acomete as populações que vivem em aglomerações urbanas sem a adequada infraestrutura sanitária e com altas infestações de roedores (BRASIL, 2014).

A infecção por este micro-organismo possui elevada ocorrência no Brasil, com uma média de 13.000 casos humanos notificados por ano, sendo 3.500 confirmados e a letalidade média é de 10,8% (BRASIL, 2014). As regiões Sudeste e Sul concentram o maior número de casos de leptospirose humana, seguidas pelo Nordeste. O estado do Rio Grande do Sul apresenta uma alta prevalência de leptospirose em humanos, com cerca de 10 casos por 100 mil habitantes, superior à média brasileira que inclui 3,5 casos por 100 mil habitantes (BARCELLOS et al., 2003; BRASIL, 2017).

A leptospirose determina no homem um quadro clínico que varia desde infecção assintomática até casos mais graves que podem ocasionar a morte do paciente (SECRETARIA DO ESTADO DE SAÚDE, 2013). Dentre os indivíduos com sinais clínicos, aproximadamente 90 a 95% apresentarão a forma anictérica da doença e 5 a 10% desenvolverão a forma ictérica, considerada a mais grave (FERREIRA; COSTA; PEREIRA, 2014). Nas fases iniciais da infecção não há distinção com várias outras doenças, especialmente de curso infeccioso, incluindo a dengue e demais viroses, sendo caracterizada por febre repentina, usualmente acompanhada de cefaleia e mialgia (SECRETARIA DO ESTADO DE SAÚDE, 2013). A síndrome de Weil é comumente descrita como icterícia, insuficiência renal e hemorragias, sendo a manifestação clássica de leptospirose grave. Contudo, em humanos, a síndrome de hemorragia pulmonar vem sendo reconhecida como uma forma grave e emergente da doença. A letalidade devido as formas graves de leptospirose é de aproximadamente 10% podendo atingir 50% dos casos quando há a síndrome de hemorragia pulmonar (BRASIL, 2014).

Para o controle da leptospirose torna-se necessária a realização de obras de saneamento básico, coleta, tratamento e destino do lixo, bem como o controle de roedores que são os principais responsáveis pela transmissão do agente etiológico desta enfermidade (PEREIRA, 2014). As medidas de profilaxia devem ser direcionadas aos reservatórios, à melhoria das condições de proteção dos trabalhadores expostos e das condições higiênico-sanitárias da população. Adicionalmente, medidas corretivas devem incluir alterações no meio ambiente, diminuindo sua capacidade de suporte para a instalação e proliferação de roedores (BRASIL, 2017). De acordo com Ferreira, Costa e Pereira (2008), o uso profilático de antimicrobianos em humanos pode ser indicado nos casos pós-exposição (enchentes, limpeza de fossas) e pré-exposição (esportes aquáticos, exercícios militares) baseando-se no uso de doxiciclina.

Por tratar-se de uma doença bacteriana há a necessidade de antimicrobiano-terapia em animais e humanos infectados por *Leptospira* spp. (FERREIRA; COSTA; PEREIRA, 2008).

Esta prática terapêutica está indicada em todas as fases clínicas e em qualquer período da doença, mas sua eficácia é maior na primeira semana do início dos sinais clínicos (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE, 2013). Bactérias do gênero *Leptospira* spp. são suscetíveis às várias classes de antimicrobianos, tais como: β -lactâmicos, macrolídeos, aminoglicosídeos, tetraciclina, fluoroquinolonas e carbapenêmicos (FAINE et al., 1999). O tempo total de tratamento compreende, em média, 7 dias (FERREIRA; COSTA; PEREIRA, 2008). Em humanos, a suspeita de qualquer fase clínica deve ser tratada e notificada no SINAN (Sistema Nacional de Agravos de Notificação), pois a leptospirose é classificada como uma doença de notificação compulsória no Brasil (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE, 2013).

Capítulo I –

(Artigo submetido ao periódico Ciência Rural – Anexo I)

Occurrence of *Leptospira* spp. and factors associated to the infection in horses from a military contingent in Rio Grande do Sul State, Brazil

Mariane Pacheco BASTIANI, Luciane Teresinha LOVATO, Ana Eucares VON LAER, Luis Antonio SANGIONI, Luciana PÖTTER, Rogério Oliveira RODRIGUES, Bianca Costabile de SOUZA, Geder Paulo HERRMANN, Sônia de Avila BOTTON

**Occurrence of *Leptospira* spp. and factors associated to the infection in horses from a
military contingent in Rio Grande do Sul State, Brazil**

**Ocorrência de *Leptospira* spp. e fatores associados à infecção em equinos de contingente
militar no estado do Rio Grande do Sul, Brasil**

**Mariane Pacheco Bastiani^I, Luciane Teresinha Lovato^{II}, Ana Eucares von Laer^{II},
Luciana Pötter^{IV}, Rogério Oliveira Rodrigues^V, Bianca Costabile de Souza^V, Geder
Paulo Herrmann^{II}, Luis Antonio Sangioni^{I,III}, Sônia de Avila Botton^{I,III*}**

Mariane Pacheco Bastiani^I

<https://orcid.org/0000-0003-3540-5297>

Luciane Teresinha Lovato^{II}

<https://orcid.org/0000-0002-8855-9217>

Ana Eucares von Laer^{II}

<https://orcid.org/0000-0001-7955-4230>

Luciana Pötter^{IV}

<https://orcid.org/0000-0002-6288-4468>

Rogério Oliveira Rodrigues^V

<https://orcid.org/0000-0002-5289-4662>

Bianca Costabile de Souza^V

<https://orcid.org/0000-0003-1609-530X>

Geder Paulo Herrmann^{II}

<https://orcid.org/0000-0002-6464-7335>

Luis Antonio Sangioni^{I,III}

<https://orcid.org/0000-0002-2364-1084>

Sônia de Avila Botton^{I,III*}

<https://orcid.org/0000-0002-8855-9217>

ABSTRACT

The occurrence of *Leptospira* spp. and factors associated to the infection were investigated in horses from a military contingent in Rio Grande do Sul State, Brazil, during 2018 to 2019. A total of 446 horses were evaluated and categorized into 309 mares (with an abortion history), 11 stallions, and 126 horses with an average age of 3 years. To determine occurrence, serum samples from all horses were submitted to the microscopic agglutination test against 12 serovars usually circulating in equine populations. To investigate the possible factors linked to the infection by *Leptospira* spp., questionnaire were applied. The occurrence in all horses was 54.5% (243/446), being 57.9% (73/126), 54% (165/309) and 45.4% (5/11) in horses with an average age of 3 years, mares and stallions, respectively. The main factors associated to the leptospirosis were contact with different water sources, presence of rodents and contact with wild and domestic animals. The high occurrence of anti-*Leptospira* spp. antibodies may be associated with the presence of these main factors. Therefore, the exposure of horses to possible reservoirs of *Leptospira* spp. should be minimized. Moreover, the immunoprophylaxis protocol should be reviewed and a shorter interval between vaccinations should be adopted to control leptospirosis in this herd.

Key-words: leptospirosis, abortion, serovars, MAT, equine.

RESUMO

A ocorrência de *Leptospira* spp. e os fatores associados à infecção foram pesquisados em equinos provenientes de um contingente militar do estado do Rio Grande do Sul, no período de 2018 a 2019. Foram avaliados um total de 446 animais, nas seguintes categorias: 309 matrizes (com histórico de abortos), 11 garanhões e 126 animais alocados na categoria com idade média de 3 anos. As amostras de soro de todos os equinos foram submetidas à técnica de soroaglutinação microscópica frente a 12 sorovares encontrados nas populações equinas.

Os possíveis fatores inerentes à infecção por este agente, foram avaliados através de questionários. A soroprevalência de aglutininas anti-*Leptospira* sp. foi de 54,5% (243/446) na população total, sendo 57,9% (73/126), 54% (165/309) e 45,4% (5/11) na população de animais com média de 3 anos de idade, nas matrizes e nos garanhões, respectivamente. Em todas as categorias o sorovar predominante foi Ballum seguido de Icterohaemorrhagiae, exceto nos garanhões onde foi seguido de Tarassovi. Os principais fatores de risco identificados foram: contato com diversas fontes de água, presença de roedores e contato com animais silvestres e domésticos. A elevada ocorrência de anticorpos anti-*Leptospira* sp. pode estar associada à presença dos fatores encontrados, portanto a exposição dos animais aos possíveis reservatórios da infecção deve ser minimizada, assim como uma reavaliação do protocolo de profilaxia, possivelmente, através da adoção de um menor intervalo entre as vacinações.

Palavras-chave: leptospirose, aborto, sorovares, SAM, equino.

INTRODUCTION

Leptospirosis is a zoonotic infectious disease caused by bacteria of the genus *Leptospira*, with 14 pathogenic species, especially *Leptospira interrogans*. Approximately 200 serovars belonging to 23 serogroups are recognized, and each one has its primary hosts, even though it may infect other species (OIE, 2014; BRASIL, 2017; SILVEIRA et al., 2017).

The spread and maintenance of the microorganism in the environment occurs mainly through carrier animal chronically infected and usually asymptomatic. They can eliminate the bacterium for months or a lifetime. This is because the bacterium can remain localized in the genital tract and kidney tissue and is eliminated via urinary discharges, there by contaminating the environment (GODOY et al., 2009; OIE, 2014; BRASIL, 2017).

Horses are susceptible to infection by a wide variety of *Leptospira* spp. serovars, causing clinical signs such as fever, jaundice, pulmonary hemorrhage, abortion, stillbirth, recurrent equine uveitis, and blindness. Leptospirosis is a common disease and probably underestimated because of the large number of chronically infected and asymptomatic animals. In equine species, this infection has been neglected; however, the recognition that the disease can cause major economic losses, mainly because of abortion and blindness in animals of high zootechnical value, has attracted greater attention to this disease (GODOY et al., 2009; CASTRO et al., 2011; ADLER, 2015).

The risk factors of leptospirosis include environmental factors, such as contact with different water sources, wetlands, rodents, and other animal species, as well as deficiencies in the health management of herds (CASELANI et al., 2012; TSEGAY et al., 2016).

Military contingent horses represent an important sector of Brazilian horse breeding. They participate in different activities (ceremonies, patrolling and guarding border areas, in sports, such as dressage, jumping, full riding competition, and polo). Usually these horses are housed in stables with strict sanitary management and rigorous reproductive control (CAMPOS et al., 2007).

The objectives of this study were to determine the occurrence of *Leptospira* spp. in horses from a military contingent and to verify the factors associated to leptospirosis in that military unit.

MATERIAL AND METHODS

This research was conducted, during 2018 to 2019, in a military unit of Rio Grande do Sul State (RS), Brazil. The study population (horses for reproduction and sports activities) comprised 309 mares, 11 stallions, and 126 horses with an average age of 3 years, according to age and reproductive management. The horses were housed in excellent sanitary conditions

and were regularly vaccinated, including for leptospirosis (administered every 6 months). However, abortions were reported in breeding mares prior to the present study. In addition to the suspicion of leptospirosis, the possibility of other etiological agents causing abortion, such as equine herpesvirus, was considered; however, the diagnosis for this agent was negative.

To confirm the suspicion of leptospirosis in the establishment, serum samples, collected 5-6 months after vaccination, from 446 horses were sent to the laboratories for leptospirosis diagnosis by microscopic agglutination test (MAT) using live antigens from *Leptospira* spp. (serovars: Australis, Ballum, Bratislava, Canicola, Copenhageni, Grippotyphosa, Hardjoprajitno, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Pyrogenes, Tarassovi, and Wolffii), according to the recommendations of OIE (2014).

To investigate the possible factors associated to the infection that could act as potential facilitators for *Leptospira* spp., questionnaire were applied to obtain information about the ambience characteristics of each animal category.

The occurrence of anti-*Leptospira* agglutinins according to serovars was analyzed among all of the studied categories by using the Kruskal-Wallis test. When differences were found in this test, the means were compared using the Bonferroni test. The analyses were performed using the SAS statistical program, version 9.2.

RESULTS AND DISCUSSION

The occurrence of anti-*Leptospira* spp. in this herd was 54.5% (243/446), the horses with an average age of 3 years, mares, and stallions showed occurrences of 57.9% (73/126), 53.4% (165/309), and 45.4% (5/11), respectively. No difference was observed between the occurrences obtained in the different categories ($P>0.05$).

The titer adopted as a cutoff point was 200 because of the endemic character of *Leptospira* spp. infection in tropical regions (PINNA et al., 2008; SIQUEIRA et al., 2019)

and to reduce the possible interference of vaccine titers on the occurrence in the studied population. Vaccine tests performed on different animal species, such as sheep (HERRMANN et al., 2011), cattle (RODRIGUES et al., 2011), buffaloes (NARDI JÚNIOR et al., 2006), and equines (MARTINS et al., 2017), have demonstrated that antibodies produced in those vaccinated with bacterin vaccines for leptospirosis could not be detected using the MAT for long periods after immunization.

In buffaloes vaccinated for leptospirosis, the MAT could be performed after 120 days without any risk of vaccine antibody interference (NARDI JÚNIOR et al., 2006). In horses, vaccination-induced antibody titers have been shown to decline after 60 days of vaccination and these titers are difficult to detect using the MAT after 90 days (MARTINS et al., 2017).

The seroprevalence varied widely in previous research in southern Brazil. In the state of Paraná, seroprevalences of 68.6% (70/102) (VIOTTO et al., 2008) and 75.8% (47/62) (FINGER et al., 2014) were detected, while in RS, studies with cart horses reported seroprevalences of 60% (75/125) in the city of Porto Alegre (LASTA et al., 2013) and 89.9% (107/119) in Pelotas (DEWES, 2017). The animals tested in all these studies were non-vaccinated; moreover, these animals presented lower titers than the minimum titer of 100, which was the cutoff for a positive MAT. Previously, we mentioned that the present study population consisted of vaccinated horses; however, a considerable number of these animals (36/243) had antibody titers ≥ 800 , suggesting a possible recent contact with the pathogen.

The occurrence of anti-*Leptospira* spp. antibodies according to the serovar was analyzed among the categories of horses (Tab. 1). In all the categories tested, the Ballum serovar was the most prevalent. Among the mares, the Icterohaemorrhagiae serovar had the same prevalence as the Ballum serovar. However, the Icterohaemorrhagiae serovar was the second most prevalent in the horses with a mean age of 3 years, and the Tarassovi serovar was the second more prevalent in the stallions. Wide reactivity to *Leptospira* spp. serovars tested

was observed in all categories, especially in the mares, which demonstrated agglutinins against all evaluated serovars. This information is relevant to the epidemiological understanding of leptospirosis (LASTA et al., 2013). However, it must be emphasized that serological analyses may suggest but not definitively identify the infecting serovar, because there is cross-serological reactivity among *Leptospira* spp. serovars and serogroups usually with lower MAT titers (OIE, 2014).

There is a relationship among *Leptospira* spp. serovars and carrier species, the Bratislava serovar has been considered the most adapted and the most frequently detected in equine species (PINNA et al., 2008 and 2010; ADLER, 2015; SIQUEIRA et al., 2019). In the studied horse population, this serovar was detected in approximately 25% (61/243), and represented the fourth most prevalent serovar. However, if these results are analyzed in combination with those obtained against the Australis serovar, a high reactivity to these two serovars (88/243) is observed. Since both serovars belong to the Australis serogroup (BHARTI et al., 2003), we can infer this serogroup has a considerable prevalence (Tab. 1).

However, seroprevalence results for the Ballum serovar are less frequent, and it is rarely identified as the most prevalent serovar in equine studies. In a study in Pelotas, RS, on cart horses found a seroprevalence of 36.1% (43/112) for the Ballum serovar (DEWES, 2017). In Chile, the Ballum serovar was the most prevalent in a population of wagon horses; and the Autumnalis serovar was the most prevalent among horses at military institutions (TADICH et al., 2016). Studies have shown a higher prevalence of the Icterohaemorrhagiae serovar in equine populations in the Brazilian states of São Paulo, Mato Grosso do Sul, Goiás (LANGONI et al., 2004), Paraná (VIOTTO et al., 2008; FINGER et al., 2014), and city of Porto Alegre, RS (LASTA et al., 2013).

Rats and mice are described as the main hosts for the Ballum serovar, even though infection has been described in wild animals (skunks, foxes, rabbits, and wild cats)

(FRIEDMANN et al., 1973). The most frequent source of infection by the Icterohaemorrhagiae serovar is rodent (*Rattus norvegicus*) contact, followed by canines, swine, cattle, horses, sheep, and goats (LANGONI et al., 2004; BRASIL, 2017). The data presented in this study indicated that the presence of rodents and contact with wild animals were the main factors identified for the studied population ($P < 0.05$). Thus, despite the possibility of cross-reaction among the serovars, the evidence suggests the involvement of the Ballum and Icterohaemorrhagiae serovars in the studied horses.

Tadich et al. (2016) warned that despite the optimal sanitary conditions in the equine facilities of the military institution they studied, 23.31% of the animals had anti-*Leptospira* spp. antibodies. Moreover, studies have hypothesized that dogs may be the source of infection of *Leptospira* spp. Tarassovi (CASTRO et al., 2011). Interestingly, stallions were the category with the highest occurrence of antibodies against the Tarassovi serovar and this was the only category that had contact with dogs (questionnaire).

According to Lasta et al. (2013) and Finger et al. (2014) the following factors may influence the seroprevalence of *Leptospira* spp.: access to different water sources, increased rainfall, flooding, presence of other animal species (domestic, wild, and synanthropic animals), deficiencies in sanitary management in a population, and favorable conditions that attract rodents. Environments containing stagnant water, moist soil, and decaying organic matter allow the bacteria to survive for up to 6 months (ADLER, 2015; BRASIL, 2017).

We could identify the main factors in the environment that may have favored the maintenance and dissemination of the agent (Tab. 2), including: contact with different water sources and wetlands, presence of rodents, and contact with wild and domestic animals (mainly cattle) ($P < 0.05$). Notably, the horses with an average age of 3 years and mares sometimes shared pastures with cattle and had contact with rodents and wild animals. The presence of rodents was also reported in the feed deposit of mares. Although rodent control

measures are performed at the evaluated establishment, the complete elimination of these synanthropic animals is difficult, especially in rural properties. Among the three animal categories studied, the stallions were the least exposed to rodents and showed a lower occurrence of antibodies against the microorganism than did the other two categories.

Although other causes of abortion may be present at this facility, the high occurrence of antibodies against *Leptospira* spp. suggests this bacterium as a probable etiological agent of the reproductive problem in the evaluated herd. Even if horses are vaccinated every 6 months, the vaccination program may not have been effective in preventing abortion in the mares, because leptospirosis vaccines are suspensions of one or several inactivated serovars, which result in attenuated immunogenic activity (OIE, 2014). Additionally, the vaccines containing bacterins are the only commercial immunobiological agents currently available against *Leptospira* spp., and they induce short-term immunity, which is serovar-specific depending on the antigens contained in the vaccine (SILVEIRA et al., 2018).

In regions with high seroprevalence and high rates of reproductive disorders, an important health management strategy is to shorten the interval between vaccinations (OIE, 2014). Another alternative would be the use of autochthonous vaccines containing *Leptospira* spp. isolates from the most prevalent serovars in a particular geographic region, since the immunity induced by vaccination is specific to homologous serovars (RODRIGUES et al., 2011; OIE, 2014;).

The immunization against leptospirosis is still an important control measure of this infection. In addition, decreasing contact with potential risk factors is fundamental to control the dissemination of the infectious agent in the environment and to susceptible individuals (PINNA et al., 2008; OIE, 2014).

CONCLUSION

The evaluated equine population showed a high occurrence of antibodies against *Leptospira* spp., especially the Ballum and Icterohaemorrhagiae serovars. The main ambience factors were contact with different water sources, presence of rodents, and contact with wild and domestic animals. Consequently, the high occurrence of anti-*Leptospira* spp. antibodies may be associated with the presence of these factors identified in this research. Therefore, the exposure of animals to possible reservoirs of *Leptospira* spp. infection have to be minimized, and the immunoprophylaxis program has to be reevaluated in order to reduce the interval between vaccinations to induce effective and long-lasting immunity in the herd.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the funding agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES) (financial code 001), Fundação de Apoio à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and Fundação de Apoio à Tecnologia e Ciência (FATEC/UFSM). Additionally, we would like to thank the Brazilian Army for the important contribution to the research.

BIOETHICS AND BIOSECURITY COMMITTEE APPROVAL

This research was approved by the Animal Use Ethics Committee at UFSM.

DECLARATION OF CONFLICT OF INTERESTS

None.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

M.P.Bastiani, L.T.Lovato, A.E. Laer, R.O.Rodrigues, G.P.Herrmann, L.A.Sangioni, and S.A.Botton conceived, designed and supervised the experiments. M.P.Bastiani, B. C.Souza, L.T.Lovato, and A.E. Laer, carried out the lab analyses. S.A.Botton supervised and coordinated the animal experiments. L.Pötter performed statistical analyses of experimental data. All authors critically revised and approved of the manuscript.

REFERENCES

- ADLER, B. **Leptospira and Leptospirosis**. Verlag Berlin Heidelberg: Springer; 2015.
- BHARTI A.R. et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 12, p. 757-771, 2003. Available from: <[http://https://www.thelancet.com/article/S1473-3099\(03\)00830-2/fulltext](http://https://www.thelancet.com/article/S1473-3099(03)00830-2/fulltext)>. Accessed: May 03, 2019. doi: 10.1016/S1473-3099(03)00830-2.
- BRASIL. **Guia de Vigilância em Saúde**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2017. p.569-585. Available from: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/outubro/06/Volume-Unico-2017.pdf>>. Accessed: Jun 24, 2019.
- CAMPOS, V.A.L. et al. Genetic and environmental effects on production traits of an equine herd of the Brazilian army. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n.1, p. 23-31, 2007. Available from: <<http://https://www.rbz.org.br/article/genetic-and-environmental-effects-on-production-traits-of-an-equine-herd-of-the-brazilian-army/>>. Accessed: May 20, 2019. doi: 10.1590/S1516-35982007000100004.
- CASELANI, K. et al. Estudo soroepidemiológico de leptospirose em equinos utilizados para tração urbana. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 3, p. 582-587, 2012. Available from: <<http://periodicos.ses.sp.bvs.br/pdf/rial/v71n3/v71n3a20.pdf>>. Accessed: Jun 03, 2019.

CASTRO, J.R. et al. Predominant *Leptospira* spp. serovars in serological diagnosis of canines and humans in the City of Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, p. 217-222, 2011. Available from: < <http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v44n2/aop12-11.pdf>>. Accessed: Jun 17, 2019. doi: 10.1590/S0037-86822011005000012.

DEWES, C. **Estudos Epidemiológicos da Leptospirose Equina na Região Sul do Rio Grande do Sul**. 2017. 59f. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

FINGER, M.A. et al. Serological and molecular survey of *Leptospira* spp. among cart horses from an endemic area of human leptospirosis in Curitiba, Southern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 6, p. 473-476, 2014. Available from: < <http://www.scielo.br/pdf/rimtsp/v56n6/0036-4665-rimtsp-56-06-473.pdf>>. Accessed: 03 Jun, 2019. doi: 10.1590/S0036-46652014000600003.

FRIEDMANN, C.T. et al. Leptospirosis ballum contracted from pet mice. **California Medicine**, v. 118, p. 51-52, 1973. Available from: < <https://journals.plos.org/plosntds/article/file?id=10.1371/journal.pntd.0007499&type=printable>> Accessed: Jun 28, 2019.

GODOY, R.C.S.; et al. Influência das leptospirosas nas infecções dos equinos: Revisão de Literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 12, 2009. Available from: <http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/MDYGfoQu8QwdT7u_2013-6-21-11-45-12.pdf>. Accessed: May 22, 2019.

HERRMANN, G.P. et al. Curva de anticorpos pós-vacinais em ovinos imunizados com uma ou duas doses de bacterina oleosa anti-leptospirose, produzida com a sorovariedade Hardjo, tipo Hardjoprajitno, estirpe Norma, isolada no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31,

n. 8, p. 683-689, 2011. Available from: <<http://www.scielo.br/pdf/pvb/v31n8/a09v31n8.pdf>>.

Accessed: Aug 08, 2019.

LANGONI, H. et al. Anti-leptospire agglutinins in equine sera, from São Paulo, Goiás, and Mato Grosso do Sul, Brazil, 1996-2001. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 10, p. 207-208, 2004. Available from: <<http://www.scielo.br/pdf/jvatitd/v10n3/21505.pdf>>. Accessed May 19, 2019. doi: 10.1590/S1678-91992004000300003.

LASTA, C. et al. Pesquisa de aglutininas anti-*Leptospira* em soros de equinos de tração em Porto Alegre, Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 23-25, 2013. Available from: <<http://periodicos.uff.br/rbcv/article/view/6935/5218>>. Accessed: Jul 06, 2019. doi: 10.4322/rbcv.2014.051.

MARTINS, G. et al. Humoral response in naturally exposed horses after leptospiral vaccination. **Journal Equine Veterinary Science**, v. 57, p. 24-28, 2017. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0737080617301119>>. Accessed: May 25, 2019. doi: 10.1016/j.jevs.2017.06.005.

NARDI JUNIOR, G. et al. Perfil de aglutininas anti-*Leptospira* em bezerras búfalas vacinadas com bacterina pentavalente comercial contra leptospirose. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 3, p. 299-304, 2006. Available from: <<http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v58n3/31019.pdf>>. Accessed: Jun 07, 2019. doi: 10.1590/S0102-09352006000300002.

OIE – World Organisation for Animal Health. **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**, 2014. Available from: <<http://www.oie.int/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>>. Accessed: May 22, 2019.

PINNA, M. et al. Seropositivity to *Leptospira interrogans* serovar Bratislava associated to reproductive problems without significant biochemical or haematological alteration in horses.

Ciência Rural, v. 40, p. 2214-2217, 2010. Available from: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v40n10/a753cr3489.pdf>>. Accessed: Aug 04, 2019. doi: 10.1590/S0103-84782010005000178.

PINNA, M.H. et al. Aplicação de um programa integrado de controle de leptospirose em equinos no Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 15, p. 63-66, 2008. Available from: <<http://periodicos.uff.br/rbcv/article/view/7062>>. Accessed: Jul 31, 2019.

RODRIGUES, R.O. et al. Comparação entre a imunidade induzida em bovinos vacinados com bacterinas polivalentes comerciais e uma monovalente experimental. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 10-16, 2011. Available from: <<http://www.scielo.br/pdf/pvb/v31n1/02.pdf>>. Accessed: May 14, 2019.

SAS. Statistical Analysis System. SAS/STAT user guide, Version 9.2. Cary, NC: SAS Institute, 2009.

SILVEIRA, M. M. et al. DNA vaccines against leptospirosis: A literature review. **Vaccine**, v. 35, n. 42, p. 5559–5567, 2017. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X17311659>>. Accessed: Jun 23, 2019. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.08.067

SIQUEIRA, C.C. et al. Seroprevalence and risk factors associated with equine leptospirosis in the metropolitan region of Salvador and Recôncavo Baiano region, Bahia state (NE Brazil). **Tropical Animal Health and Production**, p. 1-9, 2019. Available from: <<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/34727>>. Accessed: Aug 01, 2019.

TADICH, T.A. et al. Seroprevalence of *Leptospira* spp. in working horses located in the central region of Chile. **Journal Equine Veterinary Science**, v. 38, p. 14-18, 2016. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0737080615300733>>. Accessed: Jul 02, 2019. doi: 10.1016/j.jevs.2015.12.011.

TSEGAY, K. et al. Circulating serovars of *Leptospira* in cart horses of central and southern Ethiopia and associated risk factors. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 125, p. 106-115, 2016. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167587716300095>>. Accessed: Aug 12, 2019. doi: 10.1016/j.prevetmed.2016.01.009.

VIOTTO, P.S. et al. Prevalência de anticorpos para *Leptospira* spp. em equinos não vacinados na região norte do estado do Paraná. **UNOPAR Científica**, v. 10, n. 2, p. 47-52, 2008. Available from: <<https://revista.pgsskroton.com/index.php/JHealthSci/article/viewFile/1518/1455>>. Accessed: May 23, 2019. doi: 10.17921/2447-8938.2008v10n2p%25p.

Table 1. Occurrence of *Leptospira* spp. evaluated in the military horse categories included in the study.

| Serovars | Animal Category | | | | | |
|---------------------|----------------------------|-----------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|
| | Animals aged \pm 3 years | | Mares | | Stallions | |
| | N° of positive reactions | Prevalence of serovar by category | N° of positive reactions | Prevalence of serovar by category | N° of positive reactions | Prevalence of serovar by category |
| Australis | 8 | 6,34% ^a | 19 | 6,14% ^a | 0 | 0,00% ^a |
| Ballum | 36 | 28,57% ^a | 58 | 18,77% ^a | 4 | 36,36% ^a |
| Bratislava | 16 | 12,69% ^a | 45 | 14,56% ^a | 0 | 0,00% ^a |
| Canicola | 4 | 3,17% ^a | 29 | 9,38% ^a | 1 | 9,09% ^a |
| Copenhageni | 0 | 0,00% ^a | 9 | 2,91% ^a | 0 | 0,00% ^a |
| Grippotyphosa | 0 | 0,00% ^a | 39 | 12,62% ^a | 1 | 9,09% ^a |
| Hardjoprajitno | 10 | 7,93% ^a | 22 | 7,11% ^a | 1 | 9,09% ^a |
| Icterohaemorrhagiae | 23 | 19,05% ^a | 58 | 18,77% ^a | 0 | 0,00% ^a |
| Pomona | 16 | 12,69% ^a | 50 | 16,18% ^a | 0 | 0,00% ^a |
| Pyrogenes | 8 | 6,34% ^a | 18 | 5,82% ^a | 0 | 0,00% ^a |
| Tarassovi | 1 | 0,79% ^b | 22 | 7,12% ^b | 3 | 27,27% ^a |
| Wolffii | 0 | 0,00% ^a | 12 | 3,88% ^a | 0 | 0,00% ^a |

*Different letters in line indicate difference by Bonferroni test ($P < 0.05$).

Table 2. Factors associated to the leptospirosis obtained by the application of questionnaires to the equine herd included in the study, according to the different categories of horses.

| Factors | Mares | Animals aged ± 3 years | Stallions |
|---|--------------------|-------------------------------|------------------|
| Stalled | | | |
| Rodents in the feed depot | | | |
| Contact with various water sources | | | |
| Contact with wetlands | | | |
| Contact with rodents | | | |
| Contact with wild animals | | | |
| Contact with domestic animals | (cattle and sheep) | (cattle) | (dog) |
| Presentation of ocular clinical signs | | | |
| No quarantine on newly arrived animals | | | |
| Presence of risk factors in the category | 6/9 | 5/9 | 3/9 |

Caption: gray rectangle indicates the presence of the factor. White rectangle indicates absence of the facto

CONCLUSÃO

Esta pesquisa revelou uma alta ocorrência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. na população de equinos avaliada, especialmente diagnosticando os sorovares Ballum e Icterohaemorrhagiae. Os principais fatores associados à infecção identificados incluíram o contato com diferentes fontes de água, a presença de roedores e o contato com animais selvagens e domésticos. Adjacente ao histórico de aborto das matrizes e à exposição dos equinos do plantel aos fatores de risco, deve-se atentar à leptospirose como uma possível causa de aborto. Ainda que outros agentes etiológicos responsáveis por aborto possam estar circulando no local é necessário atualizar o protocolo sanitário e profilático, bem como diminuir o intervalo entre as vacinações anti-*Leptospira* spp., uma vez que as bacterinas comercialmente disponíveis induzem imunidade de curta duração.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, F. Q.; SILVA, V. P. Scientific progress in equine production at 1st decade of the XXI century. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.119-129, 2010.
- ANZAI, E. K. **Utilização da PCR para o diagnóstico da leptospirose em cães naturalmente infectados por *Leptospira* spp.** 2006. 48f. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal) – Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.
- BARROS, M. B. S; MOTA, A. E. R.; LIMA, P. F. Aborto infeccioso em égua por *Leptospira* sp. – Relato de caso. In: XIII Jornada de ensino, pesquisa e extensão – JEPEX 2013. Recife. **Anais...** Recife: UFRPE, 2013. Disponível em: <<http://www.eventosufrpe.com.br/2013/cd/resumos/R1246-3.pdf>>. Acesso em: 14 dez. 2019.
- BRASIL. **Leptospirose: diagnóstico e manejo clínico.** Brasília: Ministério da Saúde, 2014. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2014/dezembro/02/Miolo-manualLeptospirose-17-9-2014.pdf>>. Acesso em: 15 dez. 2019.
- BRASIL. *Guia de Vigilância em Saúde.* 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2017. p.569-585. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/outubro/06/Volume-Unico-2017.pdf>>. Acesso em: 15 dez. 2019.
- BARCELLOS, C. et al. Spatial distribution of leptospirosis in Rio Grande do Sul, Brazil: recovering the ecology of ecological studies. **Cad. saúde pública / Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Esc. Nac. Saúde Pública**, v. 19, n. 5, p. 1283–1292, 2003.
- BERTONE, J. J.; BROWN, C. M. **Consulta veterinária em 5 minutos: Espécie equina.** São Paulo: Manole, 2002. p. 622-623.
- BHARTI, A. R. et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infect. Dis.**, v. 3, n. 12, p. 757–771, 1 dez. 2003.
- BOLIN, C. A. Diagnosis of leptospirosis: A reemerging disease of companion animals. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animals)**, v. 11, n. 3, p. 166-171, 1996.
- CAI C. S. et al. Development of O-antigen gene cluster-specific PCRs for rapid typing six epidemic serogroups of *Leptospira* in China. **BMC Microbiology**, v.10, p. 67, 2010.
- CAMILO, M.S. **Emprego do cavalo como ferramenta para o desenvolvimento de conteúdos atitudinais.** 2017. 40f. Monografia (Trabalho de conclusão de curso de especialização em Instrutor de Equitação) - Escola de Equitação do Exército, Rio de Janeiro, 2017.
- CASELANI, K. et al. Estudo soropidemiológico de leptospirose em equinos utilizados para tração urbana. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 3, p. 582-587, 2012.
- ELLIS, W. A. Animal leptospirosis. Current topics. **Microbiology and Immunology**, v.387, p. 99-137, 2015.
- FAINE, S. et al. **Leptospira and leptospirosis.** 2. ed. Melbourne: MediSci. 1999.

FAVERO, A. C. M. et al. Sorovares de leptospiras predominantes em exames sorológicos de bubalinos, ovinos, caprinos, equinos, suínos e cães de diversos estados brasileiros. **Ciência Rural**, v. 32, n. 4, p. 613-619, 2002.

FELIX, S. R. **Leptospirose animal: estudos para o desenvolvimento de vacinas recombinantes**. 2013. 71f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva) – Programa de Pós-graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2013.

FERREIRA, T.; COSTA, V. C.; PEREIRA, N. G. Diretrizes para diagnóstico e tratamento de leptospirose. **Serviço Doenças Infecç. e Parasitárias do Hosp. Univ. Clementino Fraga Filho**, p. 1–10, 2014.

FIGUEIREDO, Í. L. et al. Leptospirose suína: uma importante causa de falhas e perdas reprodutivas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n. 4, p. 344-353, 2013.

GOMES-SOLECKI, M.; SANTECCHIA, I.; WERTS, C. **Animal models of leptospirosis: Of mice and hamsters** *Front. Immunol.* Frontiers Research Foundation, , 21 fev. 2017.

GOMES, M. J. P. Gênero *Leptospira* spp. 2015.

HAGIWARA, M. K.; LUSTOSA, M.; KOGIKA, M. M. Leptospirose canina. **Vet News**, v. 11, n. 67, p. 7-8, 2004.

HIGINO, S. S. S.; AZEVEDO, S. S. Leptospirosis in small ruminants: current epidemiological situation in Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 1, p. 86-94, 2014.

HINES, M. T. Leptospirosis, In: SELTON, D. C.; LONG, M. T. **Equine infectious diseases**. Saint Louis: Saunders Elsevier, 2007. p. 301-309.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). 2014. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/default.shtm> >. Acesso em: 16 set. 2019.

LILENBAUM, W. Leptospirosis on animal reproduction: IV. Serological findings in mares from six farms in Rio de Janeiro, Brazil (1993-1998). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 35, n. 2, p. 61-63, 1998.

MAPA (Ministério da Agricultura Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). 2014. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/equideos>>. Acesso em: 16 set. 2019.

MARTINS, G. et al. Humoral response in naturally exposed horses after leptospiral vaccination. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 57, p. 24-28, 2017.

NARDI JÚNIOR, G. et al. Interference of vaccinal antibodies on serological diagnosis of leptospirosis in vaccinated buffalo using two types of commercial vaccines. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 363-368, 2007.

OLIVEIRA, P. P. V. **Fatores de risco para leptospirose como doença ocupacional em surto no interior do Ceará: estudo de caso controle.** 2012. 58f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia e Saúde Pública) – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2012.

OIE – Organização Mundial de Saúde Animal. **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals.** 7. ed. OIE: Paris, 2014. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.12_LEPTO.pdf>. Acesso em: 10 set. 2018.

PEREIRA, E. R. **Leptospirose.** 2014. 30f. Monografia (Graduação em Farmácia) – Faculdade de Educação e Meio Ambiente, Rondônia, 2014.

PINNA, M. et al. Seropositivity to *Leptospira interrogans* serovar Bratislava associated to reproductive problems without significant biochemical or hematological alterations in horses. Soropositividade para *Leptospira interrogans* serovar Bratislava associada a falhas repro. p. 2214–2217, 2010.

PINNA, M. H.; VARGES, R.; LILENBAUM, W. Aplicação de um programa integrado de controle da leptospirose em equinos no Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 15, n. 2, p. 63-66, 2008.

PIRES NETO, J. A. S.; HESSE, F.; OLIVEIRA, M. A. M. Leptospirose equina: aspectos clínicos, tratamento, prevenção e levantamento sorológico. **Veterinária em Foco**, v. 2, n. 2, p. 165-176, 2005.

PINTO, P. S.; LIBONATI, H.; LILENBAUM, W. **A systematic review of leptospirosis on dogs, pigs, and horses in Latin America** Trop. Anim. Health Prod. Springer Netherlands, , 1 fev. 2017.

RIEDIGER, I. N. **Aplicabilidade da PCR em tempo real ao diagnóstico da leptospirose humana e ao monitoramento da contaminação ambiental por espécies patogênicas de *Leptospira*.** 2012. 148f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

RIET-CORREA, F. et al. **Doenças de Ruminantes e Equinos.** 2. ed. São Paulo: Varela, 2001.

ROCHA, T. et al. Microbiological and serological study of leptospirosis in horses at slaughter: first isolations. **Research in Veterinary Science**, v. 76, n. 3, p. 199-202, 2004.

ROLIM, M. B. Q. et al. Leptospirose em bovinos: revisão. **Medicina Veterinária**, v. 6, n. 2, p. 26-31, 2012.

ROMERO, E. C. et al. Search for agglutinating antibody to *Leptospira* and *Letonema* in horses, São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 31. n. 3, p. 210- 215, 1994.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE. Informe Técnico: **Verão, estação das chuvas, das enchentes e também da Leptospirose.** Coordenadoria de controle de doenças – Centro de vigilância epidemiológica – Divisão de Doenças Transmitidas por Vetores e Zoonoses.

2013. Disponível em: <http://www.saude.campinas.sp.gov.br/oencas/leptospirose/informes/Lepto13_informe.pdf>. Acesso em: 26 ago. 2018.

SENA, L. M. et al. Principais causas de perdas gestacionais na espécie equina: Revisão. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 10, n. 12, p. 933-345, 2016.

STODDARD, R. A. et al. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. **Science Direct**, v. 64, p. 247-255, 2009.

THOMASSIAN, A. Enfermidades infecciosas: Leptospirose. In: _____. **Enfermidades dos cavalos**. 4.ed. São Paulo: Varela, 2005.

TROEDSSON, M. H. T. Abortion. In: ROBINSON, N. E. **Current Therapy in Equine Medicine**. 5. ed. Missouri: Saunders Elsevier, 2003.


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

WHO - World Health Organization. **Human leptospirosis**: guidance for diagnosis, surveillance and control. Geneva: WHO, 2003.

ANEXOS

Comprovante da submissão do manuscrito à revista **Ciência Rural**.

23/01/2020 ScholarOne Manuscripts

 **Ciência Rural**

[# Home](#)

[/ Author](#)

[Review](#)

Submission Confirmation [Print](#)

Thank you for your submission

Submitted to
Ciência Rural

Manuscript ID
CR-2020-0055

Title
Occurrence of *Leptospira* spp. and factors associated to the infection in horses from a military contingent in Rio Grande do Sul State, Brazil

Authors
Bastiani, Mariane
Lovato, Luciane
von Laer, Ana Eucares
Potter, Luciana
Rodrigues, Rogério
Souza, Bianca
Hermann, Geder
Sangioni, Luis
Botton, Sonia

Date Submitted
23-Jan-2020

[Author Dashboard](#)

23/01/2020

ScholarOne Manuscripts

© Clarivate Analytics | © ScholarOne, Inc., 2020. All Rights Reserved.

ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.

ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,263,655.

[@ScholarOneNews](#) | [System Requirements](#) | [Privacy Statement](#) | [Terms of Use](#)