

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



Dissertação

**Estudos Epidemiológicos da Leptospirose Equina na Região Sul do Rio
Grande do Sul**

Caroline Dewes

Pelotas, 2017

Caroline Dewes

Estudos Epidemiológicos da Leptospirose Equina na Região Sul do Rio Grande do Sul

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

Orientador: Prof^o. Dr. Éverton Fagonde da Silva
Coorientador: Dr. Amilton Clair Pinto Seixas Neto

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

D517e Dewes, Caroline

Estudos epidemiológicos da leptospirose equina na região sul do Rio Grande do Sul. / Caroline Dewes ; Everton Fagonde da Silva, orientador ; Amilton Clair Pinto Seixas Neto, coorientador. — Pelotas, 2017.

57 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Leptospira. 2. Aborto. 3. Vulnerabilidade social. 4. Isolados locais. 5. Equinos. I. Silva, Everton Fagonde da, orient. II. Seixas Neto, Amilton Clair Pinto, coorient. III. Título.

CDD : 636.1

Caroline Dewes

Estudos Epidemiológicos da Leptospirose Equina na Região Sul do Rio Grande do
Sul

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

Data da Defesa:20/02/2017

Banca examinadora:

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

Prof^a. Dr^a. Fernanda de Rezende Pinto
Doutora em Veterinária Preventiva pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Prof. Dr. Leandro Quintana Nizoli
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Gilberto D'Avila Vargas
Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por tudo que tem me dado nessa vida. Tantas coisas boas quanto às dificuldades impostas, pois sem elas não teria força e persistência de chegar até aqui.

Aos meus pais, Mariza e Plínio, por tudo, tudo mesmo! Lembro quando meu pai chegava em casa com livros, sempre incentivando ao estudo! Minha mãe sempre apoiando na escola, faculdade e vida! Ao meu irmão Fernando o qual sempre admirei e minha linda sobrinha e afilhada Maria Cecília e minha cunhada Aline, muito obrigada.

Ao meu amigo e namorado Tairan pelo apoio, carinho e todo amor.

As minhas amigas Maureen, Lane, Natália, Jaura, Laura pela amizade e incentivo.

Ao pessoal do Laboratório GEDTA, Tanise, Paula, Gilmar e Amilton pela amizade e ajuda na elaboração desse trabalho.

Ao meu orientador o Doutor Professor Éverton Fagonde da Silva pelo apoio, incentivo e ajuda.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Meu muito Obrigado!!!

Resumo

DEWES, Caroline. **Estudos epidemiológicos da leptospirose equina na região sul do Rio Grande do Sul**. 2017. 57f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

Foram realizados estudos epidemiológicos da leptospirose equina na região sul do Rio Grande do Sul, a qual é uma zoonose tropical negligenciada causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira*. Primeiramente, é apresentado um estudo sorológico transversal da leptospirose em equinos de tração usados por famílias com vulnerabilidade social para a coleta de materiais recicláveis. Como resultados, 89,9% (n=107) foram reagentes para um ou mais sorovares no Teste de Soroaglutinação Microscópica (MAT) com títulos iguais ou acima de 100. Hardjo (Hardjoprajitno) foi o sorovar mais prevalente no estudo. Fatores de exposição foram avaliados através de análise univariada, revelando associação de risco entre equinos pastarem em campo nativo e a sororeatividade no MAT ($p=0,02$) e a ocorrência de aborto ($p<0,001$). Além disso, a associação de risco entre monta natural ($p<0,001$), presença de roedores ($p<0,001$) e armazenamento de ração em galpão ($p=0,03$) e a ocorrência de aborto foi significativa. Posteriormente, é descrito o primeiro relato de uveíte recorrente equina (ERU) causada por leptospiras em equinos da raça crioula no Brasil, baseado nas manifestações clínicas, no diagnóstico laboratorial e na investigação epidemiológica. É descrito também um caso de aborto por leptospirose em uma égua no município de Pelotas (RS), onde foi possível isolar o agente, caracterizar a virulência em modelo animal e a caracterização genotípica preliminar da cepa isolada. Estes resultados sugerem que através desse estudo transversal foi possível conhecer a prevalência de leptospiras, isolar o agente de cavalos usado em tração e diagnosticar uma uveíte recorrente equina em cavalos da raça crioula.

Palavras-chave: *Leptospira*; aborto; vulnerabilidade social; isolados locais; equinos

Abstract

DEWES, Caroline. **Epidemiologic studies of equine leptospirosis in Southern Brazil**. 2017. 57f. Dissertation (Master degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

Epidemiological studies of equine leptospirosis were carried out in the southern region of Rio Grande do Sul, which is a neglected tropical zoonosis caused by pathogenic bacteria of *Leptospira* genus. Firstly, a cross-sectional serological study of leptospirosis in cart horses used by families with social vulnerability for recyclable materials collection is presented. As results, 89.9% (n=107) were reagents for one or more serovars in MAT with titers equal or above 100. Hardjo (Hardjoprajitno) was the most prevalent serovar in this study. Exposure risk factors were assessed by univariate analysis showed risk association between equines grazing on native grassland and seroreactivity in MAT (p=0.02) and abortion (p<0.001). In addition, the risk association between natural mating (p<0.001), presence of rodents near house (p<0.001), storage of feed in shed (p=0.03) and abortion was significant. Subsequently, the first report of equine recurrent uveitis (ERU) caused by leptospires in horses of the Crioula breed in Brazil is described, based on clinical manifestations, laboratory diagnosis and epidemiological investigation. It is also described a case of leptospirosis abortion in a mare in the municipality of Pelotas (RS), where it was possible to isolate the agent, characterize the virulence in animal model and the preliminary genotypic characterization of the isolated strain. These results suggest that through this cross-sectional study it was possible to know the prevalence of leptospires, to isolate the agent of horses used in traction and to diagnose equine recurrent uveitis in horses of the Crioula breed.

Keywords: *Leptospira*; abortion; social vulnerability; local isolates; Horses

Lista de Figuras

- Figura 1 Amplificação dos genes SecY, LigB e LipL32 no DNA genômico da cepa isolada do feto equino e na cepa Fiocruz L1-130..... 46

Lista de Tabelas

Tabela 1	Frequência de reações dos 112 soros de equinos, de acordo com o título e o sorovar reagente no MAT.....	28
----------	---	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EMJH	Ellinghausen McCullough- Johnson- Harris
ERU	Uveíte Recorrente equina
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GEDTA	Grupo de Estudos de Doenças Transmitidas por Animais
HCV-Ufpel	Hospital de Clínicas Veterinária da Faculdade Federal de Pelotas
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
MAT	Teste de soroaglutinação microscópica

Lista de Símbolos

α	Alfa
\$	Cifrão
°C	Grau Celsius
™	Marca Registrada
®	Marca Registrada
μl	Microlitro
μm	Micrómetro
ml	Mililitro
%	Porcentagem

Sumário

1 Introdução.....	11
2 Hipótese.....	15
3 Objetivos.....	16
3.1 Objetivo Geral.....	16
3.2 Objetivos Específicos.....	16
4 Artigos.....	17
4.1 Artigo 1.....	17
4.2 Artigo 2.....	29
4.3 Artigo 3.....	37
5 Considerações Finais.....	47
Referências.....	48
Anexos.....	55

1 Introdução

A história da leptospirose começou em 1886 quando o médico Adolf Weil descreveu um tipo de icterícia acompanhada por esplenomegalia, erupções cutâneas, conjuntivite e disfunções renais, assim a enfermidade ficou conhecida como “Doença de Weil” (ADLER, 2015). Já em 1907, através da coloração de prata, Arthur Stimson, atestou a presença de espiroquetas nos túbulos renais de um paciente e observou que apresentavam as extremidades semelhantes a ponto de interrogação, assim, dando-lhe o nome de *Spirochaetae interrogans* (STIMSON, 1907).

As leptospiras são espiroquetas de aproximadamente 0,1 µm de diâmetro por 6-20 µm de comprimento e pertencem à ordem *Spirochaetales*, família *Leptospiraceae*, gênero *Leptospira*. Consiste em um material nuclear, citoplasma, membrana citoplásmica, parede celular peptidoglicana e dois filamentos axiais (flagelos periplásmicos) fixados cada um nas extremidades da *Leptospira*. São aeróbias obrigatórias com temperatura ótima de crescimento na faixa de 28° a 30 ° C (HINES, 2007; ADLER & MOCTEZUMA, 2010). Em temperaturas inferiores a 7° C a 10° C ou superiores a 34° C a 36° C as *Leptospiras* podem ser inibidas em um pH inferior a seis ou superior a oito (RADOSTITS et al., 2002).

O meio de cultura mais utilizado para leptospirose é o meio Ellinghausen McCullough- Johnson- Harris (EMJH), que contém soroalbumina bovina, ácido oleico e Tween 80 (polisorbida) (LEVETT, 2001; BHARTI et al., 2003; ADLER & MOCTEZUMA, 2009). Com o objetivo de limitar o crescimento de outros microorganismos que estão presentes juntamente com as leptospiras é adicionado antibióticos como 5-fluorouracil, polimixina B, vancomicina, rifampicina e neomicina nos meios de cultura para que haja seletividade e desenvolvimento somente das bactérias desejadas (BHARTI et al., 2003).

As bactérias causadoras da infecção pertencem a duas espécies: *Leptospira biflexa* e *Leptospira interrogans*. Sendo, somente *L. interrogans* considerada patogênica, uma vez que a *Leptospira biflexa* caracteriza-se por ser de vida livre,

considerada saprófita. Atualmente a *L. interrogans* foi reclassificada em 20 espécies: *L. alexanderi*, *L. alstonii*, *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. fainei*, *L. kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. terpstrae*, *L. weilii* e *L. wolffii*, as quais são distribuídas em mais de 260 sorovariedades, agrupadas em 23 sorogrupos (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

A leptospirose é uma zoonose amplamente distribuída, causada por espécies patogênicas de bactérias do gênero *Leptospira* (LUCAS et al., 2011). A doença afeta humanos e animais, constituindo um problema sério de saúde pública e veterinária (HARTSKEERL et al., 2011). Roedores desempenham um papel importante no ciclo da leptospirose, albergando a bactéria nos túbulos renais antes de eliminá-la na urina, contaminando o ambiente (MIRAGLIA et al., 2013). Condições precárias de saneamento básico, associadas à ocupação desordenada das cidades, alta intensidade das chuvas e à elevada infestação de roedores, tem contribuído para o aumento da incidência da enfermidade tanto nos centros urbanos como no meio rural (KO, GOARANT e PICARDEAU, 2009).

Os roedores como no caso do *Rattus norvegicus* (ratazana) comportam-se como portadores sadios, pois não revelam sinais da infecção, hospedando *Leptospiras* em seus rins e as eliminando no ambiente, contaminando o solo, a água e os alimentos, sendo o único hospedeiro a possuir equilíbrio biológico com o patógeno (ADLER & MOCTEZUMA, 2009; DAHER et al., 2010; PEREZ et al., 2011; NALLY et al., 2011).

A transmissão da leptospirose acontece pelo contato direto com a urina ou com órgãos de animais infectados penetrando ativamente através da pele, mucosas, escoriações ou cortes; ou de forma indireta, através da exposição ao ambiente contaminado com a bactéria, como água, solos úmidos, vegetação, fômites, por contato sexual ou pela inseminação artificial (FAINE, 1982; LEVETT, 2001). Dependendo das condições de sombreamento, temperatura e umidade a *Leptospira* spp. pode permanecer no ambiente por longos períodos (HASHIMOTO et al., 2012). As manifestações clínicas da leptospirose variam de acordo com o hospedeiro e o sorovar envolvido. Normalmente ocorre uveíte, aborto ou distúrbios reprodutivos, insuficiência renal, meningite, geralmente, evolui como doença aguda ou crônica, individual ou em grupos de animais, sendo que a maioria das infecções apresenta uma ausência de sinais ou sintomas clínicos (BEER, 1999; JONES et al., 2000, BAVERUD, 2009).

O Brasil dispõe do maior rebanho de equinos da América Latina sendo o terceiro mundial, com a soma de oito milhões de cabeças de equinos (cavalos) muares (mulas) e asininos (asnos) (BRASIL, 2013). Com faturamento de R\$ 7,3 bilhões nos últimos 10 anos, sendo que, em 2015 atingiu R\$16 bilhões de reais (IBGE, 2015). Somente com produção de cavalos, o rebanho envolve mais de 30 segmentos dos quais estão envolvidos os insumos, criação e destinação final gerando 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos no chamado Complexo do Agronegócio Cavalos (BRASIL, 2013). Pesquisas realizadas por Giorgio *et al.* Revelam que o primeiro relato de caso de leptospirose em um equino descrito no Brasil ocorreu em 1981 a partir de um feto abortado com o isolamento da *L. Icterohaemorrhagiae* (PESCADOR *et al.*, 2004).

A soroprevalência em equinos varia de 1% a 95% dependendo da região geográfica e dos sorovares, sendo que na região sudeste a prevalência está em torno de 17,9% a 71,9% nas regiões do Norte do país e no Nordeste está entre 23% a 100%, na região centro-oeste 45% a 74,1%, já na região sul está em torno de 60% a 87,18% (HINES, 2007).

Além de proporcionar um impacto econômico na área da saúde pública a leptospirose gera perda econômica em animais pecuários (RADOSTITS, 2002). Em equinos, as perdas econômicas que podem ser diretas (recorrentes dos custos com o tratamento e eventual morte do animal); e indiretas (causadas pela baixa produtividade, abortos, natimortos, queda da performance atlética e consequente desvalorização do cavalo) (GILGER, 2003; EBANI *et al.*, 2012). Uma infecção importante e muito frequente em equinos são as uveítes recorrentes, também chamadas de oftalmias periódicas (BRAGA *et al.*, 2011). Os sinais incluem blefaroespasmos, miose, fotofobia e em algumas ocasiões ceratite, podendo existir coriorretinite e alteração da cor da íris (HINES, 2007; ADLER & MOCTEZUMA, 2010).

No que diz respeito ao tecido renal, olhos e trato reprodutivo da fêmea as leptospirosas patogênicas apresentam tropismo quando os equinos são infectados, resultando em falência renal, oftalmia periódica, abortos e placentite (DIVERS & CHANG, 2009). A *Leptospira interrogans* sorovar Pomona é responsável por 13% dos abortos em éguas e a maioria dos abortos ocorre após os nove meses de gestação e raramente um potro vivo pode nascer com leptospirose, podendo carrear

Leptospira na placenta, rins, cordão umbilical e fígado (DIVERS & CHANG, 2009; MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012). Alguns potros infectados podem apresentar angústia respiratória, depressão, febre, icterícia e diarreia, já em equinos adultos podem apresentar febre, anorexia e letargia, sendo que icterícia e disfunção hepática também podem estar presentes (HINES, 2007). A avaliação macroscópica em fetos equinos abortados é caracterizada por icterícia, hemorragias em forma de petéquias e equimoses no pulmão, no coração, na mucosa gastrointestinal e mucosa traqueal, sendo que os rins se apresentam com uma coloração amarelada e o fígado friável e com coloração amarelo-alaranjada (PESCADOR et al., 2004). Na microscopia há infiltração inflamatória linfocitária nas tríades portais, placentite caracterizada por trombose, vasculite e infiltração de células inflamatórias no estroma juntamente com hiperplasia adenomatosa cística, necrose do epitélio, nefrite, pneumonia, encefalite e miocardite (POONACHA et al., 1994).

Cavalos usados em charretes ressurgiram na fauna urbana, utilizados pela população de baixa renda para transportar material reciclável em torno dos centros urbanos (LARA, 2006). Assim, quando infectados com leptospiros, eliminam a bactéria não apenas em suas residências, mas em vários pontos do município (HAMOND et al. 2012). Devido ao contato com animais, a leptospirose é uma importante zoonose, principalmente na zona rural, acometendo médicos veterinários, fazendeiros, magarefes, comerciantes de animais, trabalhadores de saneamento (HARTSKEERL et al., 2011).

O teste de soroaglutinação microscópica (MAT) é o padrão ouro para o diagnóstico de leptospirose e detecta anticorpos contra diversos sorovares de *Leptospira* spp (VIEIRA et al., 2013). Como descrito por Santa Rosa (1970) os soros sanguíneos são submetidos à pesquisa de aglutininas antileptospiros, através do teste de soroaglutinação microscópica (MAT), em diluições crescentes de 1:100 até 1:3200, considerando-se como resultado positivo as aglutinações iguais ou superiores a 1:100. Outro teste é a Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) que é usado para detectar ácidos nucléicos de *Leptospiras* patogênicas, através do gene da proteína LipL32, presente apenas em espécies patogênicas de *Leptospira* spp. (STODDARD et al., 2009).

2 Hipótese

A leptospirose possui ampla prevalência nos equinos de tração, atendidos no ambulatório da Faculdade de Veterinária no bairro Ceval em Pelotas/RS, e o estudo soro-epidemiológico transversal servirá para revelar os fatores de risco associados a esta enfermidade.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Realizar um estudo transversal para conhecer a prevalência da leptospirose em equinos de tração da cidade de Pelotas, atendidos no Ambulatório do Hospital de Clínicas Veterinária da Faculdade Federal de Pelotas (HCV-UFPeI), localizado no bairro Ceval.

3.2 Objetivos Específicos

- Coletar sangue de equinos para a realização do Teste de Soroaglutinação Microscópica (MAT);
- Aplicar um questionário epidemiológico aos proprietários dos animais para a análise de exposição e desfecho, elencando fatores de risco relacionados com a enfermidade;
- Realizar a inoculação de sangue de equinos em meio de cultivo visando isolar leptospiros patogênicas;
- Realizar o teste de virulência dos isolados em hamster (*Mesocricetus auratus*), avaliando as manifestações clínicas e os achados patológicos induzidos pela infecção, realizando o reisolamento do agente;
- Descrever casos clínicos da leptospirose em equinos atendidos no ambulatório do bairro Ceval.

4 Artigos

4.1 Artigo 1

Leptospirose Equina: Estudo transversal no município de Pelotas, RS

C. Dewes, T.P. Fortes, P.S. Pacheco¹, G.B. Machado, A.C.P. Seixas Neto, C.E.W. Nogueira, É.F. Silva

Será submetido à revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

Leptospirose Equina: Estudo transversal no município de Pelotas, RS

[Equine leptospirosis: Cross-sectional study in Pelotas city, RS]

Resumo

Equinos charreiros são uma prática recorrente nas cidades do Brasil. Em Pelotas (RS), famílias com vulnerabilidade social usam esses animais para a coleta de materiais recicláveis. Assim, este estudo objetivou conhecer a prevalência da leptospirose na população equina destinada a tração urbana no município de Pelotas e avaliar fatores de risco à leptospirose equina na área em estudo. Amostras de sangue de 119 equinos foram analisadas através do teste de soroprecipitação microscópica (MAT). Como resultados, 89,9% (n=107) foram reagentes para um ou mais sorovares no MAT com títulos iguais ou acima de 100. Hardjo (Hardjoprajitno) foi o sorovar mais prevalente no estudo. Fatores de exposição foram avaliados através de análise univariada, revelando associação de risco entre equinos pastarem em campo nativo e a sororeatividade no MAT ($p=0,02$) e a ocorrência de aborto ($p<0,001$). Além disso, a associação de risco entre monta natural ($p<0,001$), presença de roedores ($p<0,001$) e armazenamento de ração em galpão ($p=0,03$) e a ocorrência de aborto foi significativa. Estudos posteriores para o isolamento do agente e para a detecção da leptospiremia e leptospirúria poderão ser úteis para confirmar definitivamente a infecção nos equinos no ambiente estudado.

Palavras-chaves: *Leptospira*; isolados locais; vulnerabilidade social; Equinos

Abstract

Cart horses are a recurring practice in Brazilian cities. In Pelotas city (RS), socially vulnerable families use these animals to collect recyclable material. This study aimed to know the prevalence of leptospirosis in the cart horses population in Pelotas city and to evaluate risk factors for equine leptospirosis in the study area. Serum samples from 119 horses were analyzed by microscopic agglutination test (MAT). As results, 89.9% (n=107) were reagents for one or more serovars in MAT with titers equal or above 100. Hardjo (Hardjoprajitno) was the most prevalent serovar in this study. Exposure risk factors were assessed by univariate analysis showed risk association

between equines grazing on native grassland and seroreactivity in MAT ($p=0.02$) and abortion ($p<0.001$). In addition, the risk association between natural mating ($p<0.001$), presence of rodents near house ($p<0.001$), storage of feed in shed ($p=0.03$) and abortion was significant. Further studies for the isolation of *Leptospira* and for leptospiremia and leptospiruria detection may be useful to confirm the infection in horses in the studied environment.

Key-words: *Leptospira*; local isolates; social vulnerability; Horses

Introdução

A leptospirose é uma zoonose difundida mundialmente causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira* (FERNANDES *et al.*, 2016). As leptospiras são espiroquetas as quais estão classificadas em 21 espécies e agrupadas em 23 sorogrupos (ADLER & DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). A transmissão direta ocorre através da urina contaminada, fluidos placentários e também através de tecidos de animais infectados, sendo que a transmissão também pode ocorrer indiretamente pelo ambiente contaminado com a bactéria (BAVERUD *et al.*, 2009). Diferentes espécies de animais, tanto silvestres como domésticos, podem albergar leptospiras por longos períodos (ADLER, 2015).

A leptospirose representa uma importante perda econômica, principalmente, em éguas, pois causa aborto, natimortos, absorção embrionária, mortalidade perinatal e nascimento de potros fracos (HAMOND *et al.*, 2013). Os sinais clínicos se manifestam principalmente através da queda da performance e peso, complicações reprodutivas e oculares, porém a apresentação subclínica da leptospirose é mais comum nessa espécie (TADICH *et al.*, 2016). Em casos agudos, os equinos apresentam sintomas clínicos como febre, anorexia, apatia e anemia podendo levar a icterícia e hemorragias petequiais na mucosa (VERMA *et al.*, 2013), podendo apresentar distúrbios respiratórios e hematúria na doença clínica (BAVERDU *et al.*, 2009). Outra apresentação clínica frequentemente observada em equinos com leptospirose é a uveíte recorrente (ALI *et al.*, 2012).

Na área urbana, os equinos utilizados em charretes para o recolhimento do lixo reciclável percorrem diferentes áreas da cidade diariamente, ficando expostos a

diferentes ambientes, podendo adquirir a infecção e/ou disseminar leptospirosas não apenas em suas residências, mas em vários pontos do município (HAMOND *et al.*, 2012). Devido à ocupação desordenada das cidades, a deficiência no saneamento básico, aliados a alta aglomeração de pessoas de baixa renda e a presença de um número elevado de roedores, o meio urbano e a periferia das cidades são locais propícios para a disseminação da leptospirose (VASCONCELOS *et al.*, 2012). Na Região Sul do Brasil, a prevalência da leptospirose em equinos é variável. Estudos conduzidos em equinos utilizados para a tração, no ambiente urbano das grandes cidades, em populações humanas com extrema vulnerabilidade social, demonstram uma prevalência entre 60 e 75% (LASTA *et al.*, 2013; FINGER *et al.*, 2014).

Embora o isolamento de leptospirosas seja considerado o padrão ouro para o diagnóstico definitivo da leptospirose, o método é considerado difícil para a execução, dependente de tempo e experiência técnica (ELLIS, 2015). O teste de soroprecipitação microscópica (MAT) é mundialmente reconhecido como o principal método para o diagnóstico sorológico da enfermidade em humanos e animais. O MAT é amplamente utilizado em estudos epidemiológicos e possui como principal vantagem, a alta especificidade para os sorogrupos de leptospirosas. No entanto, não se podem diferenciar os anticorpos induzidos pela vacinação do animal dos induzidos pela infecção (ADLER & DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). Nos últimos anos, alguns métodos como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e o ELISA vêm sendo utilizados como ferramentas auxiliares para o diagnóstico de leptospirose nos equinos (VERMA *et al.*, 2013).

O presente trabalho teve como objetivos: (1) conhecer a prevalência da leptospirose na população equina destinada a tração urbana no município de Pelotas e (2) avaliar os principais fatores de risco à Leptospirose equina na área em estudo.

Material e métodos

Amostra e local de estudo. O estudo foi desenvolvido no Ambulatório do Hospital de Clínicas Veterinária da Faculdade Federal de Pelotas (HCV-UFPel), em equinos destinados a tração urbana, localizado no bairro Ceval da Cidade de Pelotas, Estado

do Rio Grande do Sul (RS), durante o período de março a setembro de 2016. Neste período, foi possível coletar 119 amostras de sangue de equinos. As amostras foram coletadas em tubos vacutainer™ com ativador de coágulo por punção da veia jugular e mantidas em refrigeração.

Teste de soroglutinação microscópica (MAT). No laboratório, as amostras foram centrifugadas e mantidas em temperatura de 20°C negativos durante prazo da realização do MAT. Todos os soros foram testados com um painel de antígenos formados por 10 sorovares de leptospiras vivas, representantes dos principais sorogrupos causadores de leptospirose no Brasil : - Australis, Autumnalis, Bataviae, Bratislava, Copenhageni, Grippothyphosa, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Pomona e Pyrogenes, os quais foram cedidos pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, acrescido do sorovar saprófita Patoc, o qual é recomendado pela OMS (WHO, 2003), e de dois isolados locais, Ballum 4E e Canicola Kito (SILVA *et al.*, 2008). O MAT foi realizado nas amostras de sangue conforme (FAINE *et al.*, 1999), onde as leptospiras foram cultivadas em meio comercial EMJH (Difco laboratories) líquido, em uma temperatura de 29°C e repicadas a cada sete dias, até a concentração em $1-2 \times 10^8$ leptospiras/ mL. Para a realização do MAT, as amostras de soro foram inicialmente diluídas em 1:12,5 em PBS estéril, pH 7,2, e o teste foi considerado reagente quando houve aglutinação de 50% ou mais das leptospiras em relação ao controle.

Questionário epidemiológico. Antes da coleta de sangue dos animais foi aplicado um questionário epidemiológico aos proprietários dos animais com o objetivo de obter informações sobre as práticas de manejo utilizadas nos equinos. Juntamente com um termo de consentimento autorizando a coleta de sangue, visando identificar possíveis associações entre os fatores de risco e seu desfecho. Um total de 29 variáveis foi incluído nas análises. No questionário, as variáveis, incluíam desde os dados do proprietário ao sexo dos animais analisados; outras espécies de animais que o proprietário possuía em casa (bovinos, equinos, ovinos, suínos, cães, caprinos, gatos); presença de roedores, formas de controle e se os roedores possuíam acesso aos alimentos ingeridos pelo equino. A fonte de água ingerida pelos equinos (encanada, poço, açude, arroio, sanga, banhado); qual a alimentação fornecida (campo nativo, pastagem, ração, milho silagem, feno, sal, lavagem, misturão) e onde o alimento era armazenado (galpão, sala separada, dentro de

casa, bombona, tonel). Também foram avaliadas o tipo de topografia da região onde residiam os proprietários (alto, baixa, mista); os piquetes utilizados pelos animais (seco ou úmido); onde permanecem à noite (estábulo, mangueira, campo, piquete) e se esse local era úmido ou não. Foi averiguado se os equinos haviam sido vacinados contra leptospirose; os sistemas de reprodução feitos pelos donos dos animais (monta natural, inseminação artificial ou ambos). Os dados clínicos, incluindo abortos na propriedade, natimortos, retorno ao cio e se havia manifestações clínicas como (icterícia, hemorragia, manifestações oculares, anemia, perda de peso, anorexia, diminuição na lactação e outros).

Aspectos éticos e análises estatísticas. Todos os procedimentos serão realizados com os conforme as diretrizes do CONCEA. Este projeto está cadastrado no COCEPE/UFPel e possui parecer favorável para a execução (CEEA 4637). As análises estatísticas foram realizadas no Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), versão 22.0 e no Epiinfo 7.

Resultados e Discussão

A leptospirose em equinos é de grande importância para os países onde essa espécie animal é usada para trabalho rural e transporte urbano. No Brasil, estudos sorológicos que foram conduzidos nestes dois cenários revelaram uma prevalência variável (5,9 a 100%), onde os sorovares causadores foram diferentes de acordo com a região geográfica (LILENBAUM, 1998; LANGONI *et al.*, 2004; LASTA *et al.*, 2013; FINGER *et al.*, 2014; OLIVEIRA FILHO *et al.*, 2014). A leptospirose equina em comunidades com vulnerabilidade social representa um grave problema de saúde pública e para a área veterinária, além de prejuízos para os proprietários dos animais.

No presente estudo, dos 119 equinos coletados, 112 (94,1%) foram reagentes para um ou mais sorovares no MAT. Os títulos variaram de 50 a 800, sendo que 107 (89,9%) animais reagiram com títulos de 100 ou mais (Tabela 1). Os sorovares que mais reagiram no MAT, independente do título, foram o Hardjo (Hardjoprajitno) representando 52,9% (n=63), seguido do Canicola (Kito) com 42% (n=50) e Ballum (4E) com 36,1% (n=43). Os sorovares que reagiram com o maior título (800) foram Copenhageni e Ballum 4E (n=2), Australis, Bratislava e Grippytyphosa (n=1). Estes

resultados evidenciam a ocorrência de aglutininas oriundas de infecção, já que apenas 3 (2,5%) animais tinham histórico de vacinação prévia.

Dentre os fatores de risco analisados através de análise univariada e usando o teste de Fisher, a associação entre os animais pastarem em campo nativo e a sororeatividade no MAT, revelou ser um risco aos animais com $p=0,02$. Esse fato pode ser atribuído a prática recorrente dos proprietários em deixar seus cavalos em terrenos próximos as suas residências onde os animais convivem com os animais da mesma espécie e com os animais não domiciliados. Esse mesmo fator de risco revelou associação com a existência de episódios de aborto, o qual foi relatado por 21,8% ($n=26$) dos proprietários com $p<0,001$. Outros fatores de risco revelaram associação com o aborto, sendo eles: - presença de galpão para o armazenamento de ração para os animais com $p=0,03$; - monta natural com $p<0,001$; e - presença de roedores na propriedade com $p<0,001$. Como fator de proteção ao aborto, foi observado que o armazenamento de ração em tonel, com $p<0,01$, seria uma alternativa para evitar o acesso da ração aos roedores e outros animais.

Todas as propriedades do estudo localizam-se em áreas planas, semelhante com a topografia predominante da região urbana de Pelotas, onde devido às baixas altitudes, está sujeita as inundações e alagamentos nos períodos de aumento do índice pluviométrico (SOUZA, 2008). De acordo com o levantamento de dados, os proprietários obtém o sustento da coleta e venda de material reciclável, sendo a sua própria residência o local para depósito, o que favorece a presença de roedores, os quais usufruem dos resíduos como abrigo e dos restos de alimentos. Estes roedores sinantrópicos são hospedeiros comumente associados com os sorovares *Ballum* e *Icterohaemorrhagiae* (BHARTI *et al.*, 2003). Em nosso estudo o sorovar *Ballum* cepa 4E, um isolado local, foi um dos antígenos com maior número de reações e com os títulos variando de 50 a 800, evidenciando a importância da presença de roedores dentro e na periferia das residências, a qual foi relatada por 77,3% ($n=92$) dos proprietários.

Outra espécie animal de grande importância na cadeia epidemiológica da leptospirose urbana é a canina. Em nosso estudo, 50 (42%) amostras dos animais reagiram com o sorovar *Canicola* (cepa Kito, isolado local), o qual é comumente associado com os cães (BHARTI *et al.* 2003). Além disso, encontramos a presença de caninos em 88,9% ($n=105$) nas propriedades, onde foi evidenciado que nenhum

animal era vacinado contra a leptospirose. Além disso, foi evidenciado um elevado número de cães não domiciliados no local. Segundo BOLIN (1996), em uma população de animais não vacinados, a ocorrência do sorovar canicola pode acometer de 50% a 75% da população de caninos. No ano de 1995, um estudo com caninos no município de Pelotas registrou a frequência de 58,1% para o sorovar canicola, 20,9% para o sorovar icterohaemorrhagiae e de 11,4% para o sorovar copenhageni (ÁVILA *et al.*, 1998).

Interessantemente, nosso estudo revelou o sorovar Hardjo como o mais predominante nas reações sorológicas. Além da ausência de histórico vacinal, o que poderia revelar aglutininas para as vacinas comercialmente disponíveis, apenas 14,2% (n=17) proprietários possuíam bovinos e 2,5% (n=3) possuíam ovinos e caprinos, espécies animais comumente associadas com esse sorovar (ELLIS, 2015). Esse achado sugere que trabalhos adicionais que priorizem o isolamento do agente devam ser realizados para a identificação dos sorovares existentes no ambiente de estudo.

A inclusão de isolados locais na bateria de antígenos do MAT é recomendada pela Organização Mundial da Saúde (WHO 2003). Em nosso estudo, pudemos observar a importância da inclusão dos isolados locais na bateria de diagnóstico, cepa Kito (Canicola) com 42% (n=50) e cepa 4E (Ballum) com 36,1% (n=43), os quais foram isolados de um canino com leptospirose fatal (SILVA *et al.*, 2008) e de um camundongo capturado em uma residência do meio rural (SILVA *et al.*, 2010), principalmente pela presença de um número elevado de roedores e de caninos no ambiente onde os equinos vivem.

A utilização de equinos para tração nas médias e grandes cidades é uma prática recorrente no Brasil. Em Pelotas, muitas famílias consideradas na situação de vulnerabilidade social utilizam-se desses animais em charretes para a coleta de lixo e materiais recicláveis, os quais transitam por diferentes bairros e percorrem variadas distâncias dentro do município, o que pode ser considerado um importante risco à saúde pública. Em nosso estudo, 94,1% (n=112) foram reagentes para um ou mais sorovares no MAT. No entanto, a detecção de anticorpos no MAT não indica apenas uma infecção corrente, mas também uma infecção prévia, já que os anticorpos podem persistir durante longos períodos após a infecção (WHO, 2003). Assim, estudos posteriores para o isolamento do agente e para a detecção da

leptospiremia e leptospirúria poderão confirmar de forma definitiva a infecção nos equinos no ambiente estudado, tendo em vista a possibilidade da disseminação do agente para humanos e animais no local das residências e em outras regiões da cidade.

Agradecimentos

CD, TPF e GBM possuem uma bolsa de pós-graduação (CAPES), PSP possui uma bolsa de iniciação científica (CNPq) e ACPSN possui uma bolsa de Pós-doutorado (CAPES).

Referências

ADLER, B. *History of leptospirosis and leptospira. Current Topics in Microbiology and Immunology*, v.387, 2015.

ADLER, B., MOCTEZUMA, A. P. Leptospira In: GYLES, G. L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, G.; THOEN, C. O. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. 4th Ed. Iowa: Blackwell Publishing, p.527-547, 2010b.

ALI, H., SAEID, S. Seroprevalence of leptospiral infection in horses, donkeys and mules 356 in East Azerbaijan province. **Afr J Microbiol Res**, v.6, n.20, p.4384-87, 2012.

ÁVILA, M. O., FURTADO, L. R. I., TEIXEIRA, M. M., ROSADO, R. L. I., MARTINS, L.F.S., BROD, C.S. Aglutininas anti-leptospíricas em cães na área de influência do centro de controle de zoonoses, Pelotas, RS, Brasil, no ano de 1995. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 28, n. 1, p. 107-110, 1998.

BAVERUD, V., GUNNARSSON, A., ENGVALL, E. O., FRAZEN, P., and EGENVALL, A. Leptospira seroprevalence and associations between seropositivity, clinical disease and host factors in horses. **Acta Vet.Scand**, v.51, p.15, 2009.

BHART, A. R.; NALLY, E. J.; RICALDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; LEVETT, P. N.; GILMAN, R.H.; WILLIG, M. R.; GOTUZZO, E.; and VINETZ, J. M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet Infectious Diseases**, v.3, p.757–71, 2003.

BOLIN, C. A. Diagnosis of Leptospirosis: A re-emerging disease of companion animals. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery Small Animal**, v.11, p.166-171, 1996.

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

FAINE, S.B.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. *Leptospira* and leptospirosis. 2.ed. Melbourne, Australia: **MediSci**, 1999. 296p.

HAMOND, C.; MARTINS, G.; LAWSON-FERREIRA, R.; MEDEIROS, M.A.; LILENBAUM, W. The role of horses in the transmission of leptospirosis in an urban tropical area. **Epidemiology and Infection**, v.141, n.1, p.33-35, 2012.

HAMOND, C.; MARTINS, G.; MEDEIROS, M. A.; LILENBAUM, W. Presence of Leptospiral DNA in Semen Suggests Venereal Transmission in Horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.33, p.1157-1159, 2013.

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

LASTA, C. S.; OLIVEIRA, S. T.; MERINI, L. P.; DASSO, M. G.; PEDRALLI, V.; GONZÁLEZ, F. H. D. 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.

LILENBAUM, W. Leptospirosis on animal reproduction: IV. Serological findings in mares from six farms in Rio de Janeiro, Brazil (1993-1996). **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, v. 35, n. 2, p. 61-63, 1998.

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

SILVA, É.F.; SANTOS, C.S.; ATHANAZIO, D.A.; SEYFFERT, N.; SEIXAS, F.K.; CERQUEIRA, G.M.; FAGUNDES, M.Q.; BROD, C.S.; REIS, M.G.; DELLAGOSTIN, O.A.; KO, A.I. Characterization of virulence of *Leptospira* isolates in a hamster model. **Vaccine**, v.26, p.3892-3896, 2008.

SILVA, É. F., FÉLIX, S. R., CERQUEIRA, G. M., FAGUNDES, M. Q., NETO, A. C. P. S., GRASSMANN, A. A., DELLAGOSTIN, O. A. Short Report : Preliminary Characterization of *Mus musculus* – Derived Pathogenic Strains of *Leptospira borgpetersenii* Serogroup Ballum in a Hamster Model, **83(2)**, 336–337, 2010.

SOUSA, C.A.T. **Análise Crítica do Sistema de Macrodrenagem do Santa Bárbara – Pelotas/RS** 84f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização programa de Pós-Graduação Curso Gestores Regionais de Recursos Hídricos) - Faculdade de Engenharia Agrícola Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS, 2008.

TADICH, T. A.; TAPIA, C.; GONZALEZ, D. Seroprevalence of *Leptospira* spp. in working horses located in the central region of Chile. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.38, p.14-18, 2016.

VASCONCELOS, C.H.; FONSECA, F.R.; LISE, M.L.Z.; ARSKY, M.L.N.S. Fatores ambientais e socioeconômicos relacionados à distribuição de casos de leptospirose no Estado de Pernambuco, Brasil, 2001–2009. **Cadernos Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 1, p.49-56, 2012.

VERMA, A., STEVENSON, B., ADLER, B. Leptospirosis in horses. **Vet Microbiol**, v.339, n.167, p.61-66, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Internation Leptospirosis Society. Human Leptospirosis: **Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control**. Geneva, Switzerland: WHO; 2003.

Tabela 1. Frequência de reações dos 112 soros de equinos, de acordo com o título e o sorovar reagente no MAT.

Antígeno	Título (MAT)				
	50	100	200	400	800
Australis	4	3	5	4	1
Autumnalis	7	7	3	-	-
Bataviae	3	8	-	-	-
Bratislava	9	9	11	6	1
Copenhageni	2	4	7	2	2
Grippotyphosa	8	11	6	3	1
Hardjo	14	17	25	6	-
Icterohaemorrhagiae	11	8	1	-	-
Pomona	2	6	7	-	-
Pyrogenes	7	6	4	1	-
Ballum 4E*	7	15	16	3	2
Canicola Kito*	8	13	16	13	-
Patoc	32	-	-	-	-

*Isolados locais

4.2 Artigo 2

Uveíte recorrente em uma égua com leptospirose: relato de caso

C. Dewes, K.L. Goularte, P.S. Pacheco, T.P. Fortes, G.B. Machado, A.C.P. Seixas
Neto, É.F. Silva

Submetido ao periódico científico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e
Zootecnia

Uveíte recorrente em uma égua com leptospirose: relato de caso

[Recurrent uveitis in a mare with leptospirosis: a case report]

RESUMO

A uveíte recorrente equina (ERU) é uma importante causa de cegueira em equinos, podendo afetar um ou ambos os olhos. A infecção dos equinos com leptospirosas patogênicas é considerada a causa mais comum de ERU em todo o mundo. Embora não exista um teste específico para o diagnóstico laboratorial da ERU associada com leptospirosas, o teste de aglutinação microscópica (MAT) tem sido considerado um valioso indicador da infecção leptospiral. Este relato descreve um caso de ERU em uma égua da raça crioula baseado nas manifestações clínicas, no diagnóstico laboratorial e na investigação epidemiológica. Este é o primeiro relato de ERU causada por leptospirosas em equinos da raça crioula no Brasil.

ABSTRACT

Equine recurrent uveitis (ERU) is an important cause of blindness in horses, affecting one or both eyes. Equine infection with pathogenic leptospires is considered as the most common cause of ERU worldwide. Although there is no specific test for the laboratory diagnosis of *Leptospira*-associated ERU, the microscopic agglutination test (MAT) has been considered as a valuable indicator of leptospiral infection. This report describes a case of ERU in a mare of creole breed based on clinical manifestations, laboratory diagnosis and epidemiological investigation. To the best of our knowledge, this is the first report of ERU caused by leptospires in horses of the Crioula breed in Brazil.

INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose causada por espécies patogênicas do gênero *Leptospira*, a qual é endêmica em várias partes do mundo (Verma *et al.*, 2013). A incidência da enfermidade e a presença dos sorovares variam consideravelmente entre as regiões do planeta, ocorrendo principalmente nos países em desenvolvimento com clima tropical (Ko *et al.*, 2009). Embora a maioria dos casos apresente a forma leve assintomática da doença, a leptospirose humana e animal possui amplo espectro de manifestações clínicas, podendo ser confundida com outras enfermidades em sua fase inicial (Ko *et al.*, 2009; Ellis, 2015).

A leptospirose em equinos apresenta manifestações clínicas normalmente associadas com complicações reprodutivas, queda na performance, perda de peso e manifestações oculares. No entanto, a apresentação subclínica da doença é a mais comum nessa espécie animal (Ellis, 2015). Estudos epidemiológicos baseados no levantamento de fatores de risco a enfermidade e na sorologia, apontam para uma prevalência variável e dependente da região geográfica investigada (Verma *et al.*, 2013). No Brasil, a prevalência da leptospirose em equinos varia de 5,9 a 100% (Lilenbaum, 1998; Langoni *et al.*, 2004; Oliveira Filho *et al.*, 2014).

A uveíte recorrente equina (ERU) é uma das principais causas de cegueira em equinos e apresenta-se como uma inflamação não-granulomatosa que se repete em intervalos imprevisíveis (Malalana *et al.*, 2015). Conhecida também como cegueira da lua, a uveíte ocorre meses ou até anos após ser adquirida naturalmente pela infecção por leptospirosas patogênicas (Hartskeerl *et al.*, 2004). Embora a patogenia da ERU ainda seja desconhecida, ela é considerada uma doença imunomediada e associada a determinadas raças de equinos (Malalana *et al.*, 2015). O diagnóstico da ERU é baseado na presença de sinais clássicos da uveíte, na recorrência e na sororeatividade no MAT (Verma *et al.*, 2012).

Este relato descreve um caso de ERU em uma égua da raça crioula, baseado nas manifestações clínicas, no diagnóstico laboratorial e na investigação epidemiológica.

CASUÍSTICA

No mês de julho de 2015, no município de Piratini (RS), uma égua com 8 anos de idade apresentou uma lesão opaca no olho direito. Quatro dias depois

apresentou uma lesão semelhante no olho esquerdo, não revelando reflexos ao exame clínico realizado. Como medida terapêutica, foi realizada a antibioticoterapia, uso de corticosteróides e terapia de suporte. Após o período de 10 dias do tratamento inicial, quando a égua foi submetida ao exercício, ocorreu recidiva e a manifestação ocular foi novamente observada. Como conduta terapêutica, foi realizada novamente a antibioticoterapia e o tratamento de suporte. Neste momento, uma amostra de sangue foi encaminhada para a realização do diagnóstico laboratorial (Amostra 1). Após 15 dias, uma segunda amostra de sangue foi novamente coletada para a realização do diagnóstico laboratorial (Amostra 2). Durante todo o período, a égua foi mantida em confinamento, sendo alimentada com ração e volumoso. Alguns roedores foram observados no ambiente de alojamento do animal e medidas para a eliminação dos mesmos foram realizadas.

No laboratório, o MAT foi realizado nas duas amostras de sangue conforme, utilizando como antígeno os seguintes sorovares: *L. interrogans* Pomona Pomona, *L. interrogans* Icterohaemorrhagiae RGA, *L. kirschneri* Grippotyphosa Moskva V, *L. santarosai* Bataviae Swart, *L. interrogans* Australis Ballico, *L. interrogans* Australis Bratislava, *L. interrogans* Pyrogenes Salinem, *L. interrogans* Sejroe Hardjoprajitno, *L. interrogans* Copenhageni M20, *L. interrogans* Autumnalis Akiyami A, *L. biflexa* Semarang Patoc 1, e os isolados locais *L. interrogans* Canicola Kito e *L. borgpetersenii* Ballum 4E. Para os dois testes, as leptospiros foram cultivadas em meio comercial EMJH (Difco laboratories) líquido, em uma temperatura de 29°C e repicadas a cada sete dias, até a concentração em $1-2 \times 10^8$ leptospiros/ mL. Para a realização do MAT, as amostras de soro foram inicialmente diluídas em 1:12,5 em PBS estéril, pH 7,2, e o teste foi considerado reagente quando houve aglutinação de 50% ou mais das leptospiros em relação ao controle.

A Amostra1, a qual foi coletada após a ocorrência das manifestações clínicas e a conduta terapêutica inicial, revelou o seguinte resultado: - *L. interrogans* Canicola 1:200; *L. interrogans* Autumnalis 1:100; *L. interrogans* Pomona 1:50; *L. interrogans* Australis 1:50; *L. interrogans* Pyrogenes 1:50; *L. interrogans* Bratislava 1:50. Após 15 dias, a fim de detectar a soroconversão, a Amostra2 foi coletada e testada, revelando o seguinte resultado: - *L. interrogans* Canicola 1:400; *L. interrogans* Autumnalis 1:400; *L. interrogans* Australis 1:200; *L. interrogans* Bratislava 1:200.

DISCUSSÃO

A ERU possui um impacto negativo para os animais e para os proprietários. Além dos custos elevados para o diagnóstico e o tratamento da doença, incluindo as recidivas, os animais acometidos possuem uma alta frequência de sequelas como a perda da visão, que pode ser uni ou bilateral, a perda da função ocular, e em alguns casos, existe a necessidade da eutanásia do animal (Gerding *et al.*, 2016). Quanto mais precoce for realizado o diagnóstico da ERU causada por leptospiros, o qual é baseado na presença de sinais clínicos da uveíte, na história da recorrência e na sororeatividade no MAT, melhor será o prognóstico para o animal (Malalana *et al.*, 2015; Gerding *et al.*, 2016). No entanto, até o momento, não existe nenhum teste disponível exclusivamente para o diagnóstico da ERU causada por leptospiros (Verma *et al.*, 2013).

Nos casos de ERU, para um prognóstico favorável da enfermidade aguda, o emprego de uma intervenção terapêutica rápida favorece a diminuição do processo inflamatório, diminuindo ou evitando a doença recorrente. Por outro lado, o emprego de antibioticoterapia durante a fase aguda pode mascarar o aparecimento de sinais clínicos da doença e interferir na detecção e quantificação da resposta imune nesta fase, tendo em vista a variabilidade na suscetibilidade aos antibacterianos entre os sorovares leptospirais (Malalana *et al.*, 2015; Gerding *et al.*, 2016).

No Brasil, estudos epidemiológicos da leptospirose em equinos ao longo dos anos revelaram uma prevalência variável entre as regiões do país. Em um estudo sorológico realizado em éguas com problemas reprodutivos no Estado do Rio de Janeiro, revelou uma prevalência de 42,96%, onde o sorovar predominante foi *Icterohaemorrhagiae*, seguido por Bratislava e Pomona (Lilenbaum, 1998). Langoni *et al.* (2004) em um estudo com 1.402 soros de equinos provenientes dos Estados de São Paulo, Goiás e Mato Grosso do Sul, os autores encontraram uma prevalência de 54%, com o sorovar *Icterohaemorrhagiae* sendo o mais prevalente. No Estado da Paraíba, um estudo sorológico foi conduzido em equídeos nos municípios do brejo paraibano, utilizando amostras de equinos (n=257), de mulas (n=46) e de burros (n=7), encontrando uma prevalência de 16,2% em equinos, 13% em mulas e 28,6% em burros (Oliveira Filho, 2014).

Estudos de soroprevalência e isolamento no mundo indicam que os equinos são suscetíveis a uma ampla variedade de leptospiros, tais como Pomona, Grippotyphosa, *Icterohaemorrhagiae*, Autumnalis, Sejroe, Canicola e Ballum, no

entanto, o sorovar Bratislava é considerado o mais comum mundialmente (Arent *et al.*, 2015; Ellis, 2015). Em nosso relato, demonstramos a soroconversão para quatro sorovares leptospirais, importantes para a saúde pública e veterinária. A Amostra2, revelou uma co-aglutinação entre os sorovares Canicola e Autumnalis, ambos com o maior título, seguidos por Australis e Bratislava. Em contrapartida, os sorovares Pomona e Pyrogenes não soroconverteram. Todos os sorovares reagentes neste relato são comumente associados com a ocorrência mundial de ERU em equinos (Hartskeerl *et al.*, 2004; Verma *et al.*, 2010).

Entre as limitações do nosso relato, destacam-se a impossibilidade do uso de técnicas para o isolamento do agente e a detecção do DNA leptospiral tanto no sangue, na urina e no humor vítreo, amplamente empregadas para a confirmação do agente causador da ERU. Embora o MAT ainda seja o teste amplamente utilizado para os casos de ERU, algumas estratégias para o desenvolvimento de testes para o diagnóstico da ERU e o conhecimento da patogenia da enfermidade vêm sendo utilizadas nos últimos anos. A identificação da expressão intraocular de duas lipoproteínas leptospirais, a LruA e a LruB (*Leptospiral Recurrent Uveitis associated proteins A and B*) no fluido ocular de equinos com uveíte, e a detecção de altos níveis de Imunoglobulina A e G anti-LruA e B no fluido ocular demonstram a importância dessas lipoproteínas na patogênese da enfermidade, bem como a participação destes anticorpos na resposta auto-imune, já que esses além de reconhecerem as lipoproteínas leptospirais, reagem de forma cruzada contra componentes próprios do olho (Verma *et al.*, 2010; Verma *et al.*, 2013).

Alguns estudos que utilizaram marcadores genéticos para a ERU indicam que os animais da raça Appaloosa possuem oito vezes mais predisposição para desenvolver ERU do que as demais raças estudadas. Além disso, o prognóstico da doença nos animais da raça Appaloosa, em relação às sequelas na visão dos animais, será agravado quando a causa da ERU for o sorovar Pomona (Verma *et al.*, 2012; Gerding *et al.*, 2016). Em um recente estudo, também foram identificados componentes genéticos para o desenvolvimento da ERU em equinos da raça German Warmblood (Gerding *et al.*, 2016). No Brasil, não há relatos que indiquem a pré-disposição genética e/ou suscetibilidade dos animais da raça crioula para o desenvolvimento da ERU causada por leptospiras.

Este relato descreve um caso de ERU em uma égua da raça crioula baseado nas manifestações clínicas, no diagnóstico laboratorial e na investigação

epidemiológica. No caso relatado, o diagnóstico clínico na fase aguda da ERU, a confirmação diagnóstica e o tratamento precoce contribuíram de forma favorável na recuperação do paciente e na redução da ocorrência de sequelas, tendo em vista o impacto negativo da ERU para o animal. Assim, este é o primeiro relato de ERU causada por leptospirosas em equinos da raça crioula no Brasil.

REFERÊNCIAS.

ARENT, Z.; GILMORE, C.; BREM, S.; ELLIS, W.A. Molecular studies on European equine isolates of *Leptospira interrogans* serovars Bratislava and Muenchen. *Infection, Genetics and Evolution*.v.34, p.26–31, 2015.

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

GERDING, J.C.; GILGER, G.C. Prognosis and impact of equine recurrent uveitis. *Equine Veterinary Journal*.v.48, p.290–298, 2016.

HARTSKEERL, R.A.; GORIS, M.G.A.; BREM, S.; MEYER, P.; KOPP, H.; GERHARDS, H.; WOLLANKE, B. Classification of *Leptospira* from the Eyes of Horses Suffering from Recurrent Uveitis. *J. Vet. Med. B.*, v.51, p.110–115, 2004.

KO, A. I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nature Reviews Microbiology*. v.7, p.736-747, 2009.

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

LILENBAUM, W. Leptospirosis on animal reproduction: IV. Serological findings in mares from six farms in Rio de Janeiro, Brazil (1993-1996). *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, v. 35, n. 2, p. 61-63, 1998.

MALALANA, F.; STYLIANIDES, A.; MCGOWAN, C. Equine recurrent uveitis: Human and equine perspectives. *The Veterinary Journal*.v.206, p.22–29, 2015.

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

VERMA A.; KUMAR P.; BABB K.; TIMONEY J.F.; STEVENSON B. Cross-Reactivity of Antibodies against Leptospiral Recurrent Uveitis-Associated Proteins A and B

(LruA and LruB) with Eye Proteins. PLOS Neglected Tropical Diseases 4(8): e778, 2010.

VERMA A.; STEVENSON B. Leptospiral Uveitis – There Is More to It Than Meets the Eye! Zoonoses Public Health 59 (Suppl. 2).p.132–141, 2012.

VERMA A.; STEVENSON B.; ADLER, B. Leptospirosis in horses. Veterinary Microbiology.v.167, p.61–66, 2013.

4.3 Artigo 3

Isolamento de *Leptospira* em aborto equino: relato de caso

C. Dewes, T.P. Fortes, P.S. Pacheco, G.B. Machado, A.C.P. Seixas Neto, B.R. Curcio, F. M. Pazinato, O.A. Dellagostin, É.F. Silva

Submetido ao periódico científico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

Isolamento de *Leptospira* em aborto equino: relato de caso

[*Leptospira* isolation in equine abortion: a case report]

RESUMO

Estudos sorológicos da leptospirose em equinos demonstram que a doença ocorre em todo o mundo. A frequência de aglutininas anti-*Leptospira* varia entre os países e existe uma grande susceptibilidade dos animais em relação aos sorovares predominantes. A maioria das infecções permanece assintomática, mas o aborto e a morte fetal são sequelas comuns da leptospirose equina. Este relato descreve um caso de aborto por leptospirose em uma égua no município de Pelotas (RS), onde foi possível isolar o agente, caracterizar a virulência em modelo animal e a caracterização genotípica preliminar da cepa isolada.

ABSTRACT

Serological studies of leptospirosis in horses showed that the disease occurs worldwide. The frequency of anti-*Leptospira* agglutinins varies between countries and there is a high susceptibility of the animals in relation to the predominant serovars. The majority of infections remain asymptomatic but abortion and stillbirth are common sequels of equine leptospirosis. This report describes a case of leptospirosis abortion in a mare occurred in the municipality of Pelotas (RS), which it was possible to isolate the agent, the characterization of virulence in animal model and the preliminary genotypic characterization of the isolated strain.

INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma enfermidade que acomete os animais e os humanos no mundo, possuindo importantes consequências econômicas (Ellis, 2015). Nos equinos, a prevalência da enfermidade e a presença dos sorovares que causam a doença variam consideravelmente no mundo (Verma *et al.*, 2013). Embora a apresentação subclínica da doença seja a mais comum nessa espécie animal, a leptospirose equina apresenta manifestações clínicas normalmente associadas com complicações reprodutivas, queda na performance, perda de peso e manifestações oculares (Ellis, 2015).

No Brasil, a prevalência da leptospirose em equinos é variável. Estudos conduzidos em equinos utilizados para a tração, no ambiente urbano das grandes cidades da Região Sul, em populações humanas com extrema vulnerabilidade social, demonstram uma prevalência entre 60 e 75%, com o sorovar *Icterohaemorrhagiae* sendo o mais prevalente nestes estudos (Lasta *et al.*, 2013; Finger *et al.*, 2014), o que pode ser atribuído a endemicidade da leptospirose entre os roedores sinatropicos dos municípios.

Marcolongo-Pereira *et al.* (2012) em um estudo retrospectivo em equinos do sul do Brasil, no período compreendido entre 2000 e 2011, identificaram como as principais causas de aborto em éguas os seguintes agentes: - bacterianos (68,4%); - não infecciosos (15,8%); - virais (7,9%); e parasitários (2,6%). Entre os agentes bacterianos, os principais causadores foram *Klebsiella pneumoniae* (5,6%), *Leptospirasp.* (5,6%) e *Streptococcus* beta hemolítico (5,6%).

Abortos causados por leptospirosas geralmente são confirmados pela demonstração do agente através de técnicas como imunofluorescência (IF) e imunohistoquímica (IHQ) nos tecidos fetais (Szeredi *et al.*, 2006), já que o isolamento do agente é limitado pelas dificuldades de cultivo e expertise técnica (Ellis, 2015). No Brasil, a primeira notificação sobre a ocorrência dos dois primeiros casos de abortamento em éguas causado por leptospirosas foi publicado em 1958. Posteriormente, Freitas *et al.* (1960) demonstraram leptospirosas em tecidos de fetos abortados através da microscopia de campo escuro, e apenas no início da década de 80 foi relatado o primeiro isolamento de leptospirosas patogênicas a partir de um feto equino abortado (Pescador *et al.*, 2004). Posteriormente, Yasuda *et al.* (1986)

isolaram leptospirosas saprófitas de um feto equino abortado, embora não tenha sido possível concluir que tenha sido a verdadeira causa do abortamento.

Este relato teve como objetivos: (1) descrever um caso de aborto por leptospirose em uma égua ocorrido no município de Pelotas, no qual foi possível o isolamento do agente; (2) realizar a caracterização da virulência em modelo animal; e (3) realizar a caracterização genotípica preliminar da cepa isolada.

CASUÍSTICA

Em abril de 2016, durante a execução do projeto intitulado de “Estudo transversal da leptospirose em equinos do município de Pelotas/RS” (processo nº23110.004637/2015-18; Parecer favorável da CEEA/UFPel), uma égua adulta com aproximadamente 9 anos de idade, abortou durante o exame clínico. Na anamnese, o proprietário informou sobre o local onde a égua era mantida, que tinha contato com outros animais (cães e roedores) e que possuía um histórico de retorno ao cio, natimortos e aborto. Foi realizada a coleta de sangue da égua e o feto foi encaminhado para a necropsia no setor de patologia da Faculdade de Veterinária da UFPel, onde foi coletado asépticamente um volume de 5 ml de sangue fetal e um fragmento de 5 cm³ de um dos rins do animal. Durante a realização da necropsia, fragmentos de diversos órgãos foram coletados e fixados em formalina tamponada para posterior processamento.

Para a tentativa de isolamento de leptospirosas os macerados e inoculados diretamente em meio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) semi-sólido enriquecido com suplemento comercial. Os cultivos foram incubados em estufa bacteriológica e mantidos a 29°C. Amostras de sangue fetal também foram cultivadas e mantidas nas mesmas condições. As culturas positivas foram repicadas para meio EMJH líquido e utilizadas para extração do DNA genômico através de kit comercial (illustra™ bacteria genomicPrep Mini Spin Kit – GE Healthcare®).

A caracterização molecular preliminar da cepa isolada foi realizada a partir de PCR, utilizando como molde o DNA genômico extraído e oligonucleotídeos que amplificam os genes LipL32, LigB e SecY. Como controle positivo, utilizou-se o DNA da cepa Fiocruz L1-130. Cada reação foi realizada em um volume final de 25 µl, 12,5 µl de mix (PCR Master Mix – Promega), 9,5 µl de água ultrapura, 1 µl de cada

oligonucleotídeo e 1 µl de DNA genômico. A reação foi submetida a um processo de desnaturação inicial (94°C, 5 min), seguido por 35 ciclos de desnaturação (94°C, 1 min), anelamento (55°C, 1 min) e extensão (72°C, 1 min). Após os 35 ciclos, a reação foi submetida a um ciclo final de extensão a 72°C por 10 min. Para avaliação do resultado, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 0,8% e submetidas à eletroforese em cuba horizontal. O gel foi visualizado sob luz UV. Paralelamente, as culturas positivas foram inoculadas dois hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos, oriundos do Biotério Central da UFPel, com 4 semanas de idade, através do desafio intraperitoneal com a inoculação de aproximadamente 10^8 leptospiros. Quando os animais apresentaram sinais clínicos compatíveis com a doença clínica, foram eutanasiados e os rins usados para inoculação em meio EMJH semi-sólido.

O MAT foi realizado na amostra de sangue da égua utilizando como antígeno os seguintes sorovares: *L. interrogans* Pomona Pomona, *L. interrogans* Icterohaemorrhagiae RGA, *L. kirschneri* Grippotyphosa Moskva V, *L. santarosai* Bataviae Swart, *L. interrogans* Australis Ballico, *L. interrogans* Australis Bratislava, *L. interrogans* Pyrogenes Salinem, *L. interrogans* Sejroe Hardjoprajitno, *L. interrogans* Copenhageni M20, *L. interrogans* Autumnalis Akiyami A, *L. biflexa* Semarang Patoc 1, e os isolados locais *L. interrogans* Canicola Kito e *L. borgpetersenii* Ballum 4E. Para o teste, as leptospiros foram cultivadas em meio comercial EMJH (Difco laboratories) líquido, em uma temperatura de 29°C e repicadas a cada sete dias, até a concentração em $1-2 \times 10^8$ leptospiros/ mL. Para a realização do MAT, as amostras de soro foram inicialmente diluídas em 1:12,5 em PBS estéril, pH 7,2, e o teste foi considerado reagente quando houve aglutinação de 50% ou mais das leptospiros em relação ao controle.

A amostra de sangue da égua, a qual foi coletada após o aborto, revelou o seguinte resultado: - *L. kirschneri* Grippotyphosa Moskva V (1:800); *L. borgpetersenii* Ballum 4E(1:800); *L. interrogans* Sejroe Hardjoprajitno (1:400); *L. santarosai* Bataviae Swart (1:200) e *L. interrogans* Australis Bratislava (1:50).

Quando o cultivo da cepa apresentou um crescimento de 10^8 leptospiros/mL, foi realizada a extração do DNA genômico, seguida pela PCR. A amplificação de lipL32, ligB e SecY na cepa isolada do feto abortado e na cepa L1-130 podem ser visualizadas na Figura 1. A amplificação de lipL32 e ligB, confirmou a patogenicidade da cepa isolada, uma vez que estes genes só estão presentes em

cepas patogênicas. A amplificação de SecY servirá para o seu posterior sequenciamento e o alinhamento com múltiplas sequencias disponíveis no banco de dados (GenBank).

O resultado do teste de virulência revelou que a cepa foi capaz de reproduzir os principais achados clínicos da leptospirose experimental. Os sinais clínicos encontrados nestes dois grupos de animais iniciaram a partir do 5º dia, manifestando prostração, isolamento na caixa, desidratação, perda de peso e o óbito dos animais inoculados entre o 7º e 8º dia. Após a necropsia dos hamsters, foram evidenciadas alterações macroscópicas descritas como típicas da leptospirose experimental, como a icterícia nas mucosas, a congestão de órgãos e hemorragia pulmonar. O reisolamento da cepa foi obtido com sucesso a partir do cultivo do tecido renal dos animais submetidos ao teste de virulência.

DISCUSSÃO

Estudos sorológicos da leptospirose em equinos no Brasil e no mundo apontam para uma ocorrência de aglutininas anti-leptospiras variável entre os países e uma ampla suscetibilidade dos animais em relação aos sorovares predominantes (Verma *et al.*, 2013). Embora o sorovar Bratislava seja considerado como o mais prevalente em equinos no mundo (Ellis, 2015) e indicado como um sorovar adaptado a espécie equina (Bharti *et al.*, 2003), outros sorovares como Pomona, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Autumnalis, Serjoe, Canicola e Ballum também são associados com a doença (Hartskeerl *et al.*, 2004). Entretanto, o sorovar leptospiral mais associado com aborto em éguas é o Pomona (Verma *et al.*, 2013).

Em nosso relato, o MAT realizado com a amostra de sangue da égua, a qual foi coletada no mesmo dia do aborto, revelou reações com maiores títulos para os sorogrupos Grippotyphosa e Ballum, seguido de reações com os sorovares Hardjo, Bataviae e Bratislava. Esse resultado é coerente com os demais estudos sorológicos realizados no Brasil e no mundo, embora seja evidente a ausência de reações contra Icterohaemorrhagiae, Canicola e Pomona, mesmo que o proprietário tenha relatado que a égua teve contato com caninos e roedores sinantrópicos na propriedade. Os sorogrupos Grippotyphosa e Ballum estão associados com mamíferos sinantrópicos e silvestres, como os camundongos e os marsupiais (Bharti

et al., 2003), os quais podem ser encontrados no ambiente urbano e na periferia do município de Pelotas (RS).

No Rio de Janeiro, Hamond *et al.* (2013) estudaram a transmissão sexual entre equinos como um potencial modo de transmissão da leptospirose entre os animais. Em nosso relato, o proprietário do animal informou que a égua possuía histórico de retorno ao cio e abortos anteriores, revelando outro potencial fator de exposição para a infecção, já que a monta natural ocorre entre animais que convivem no mesmo ambiente, em uma comunidade de charreteiros com elevada vulnerabilidade social, onde os equinos são utilizados para a coleta de material reciclável no meio urbano do município.

O isolamento de leptospiras é considerado o padrão ouro para o diagnóstico definitivo da leptospirose (Ellis, 2015). Embora seja um procedimento considerado difícil e que demande tempo e experiência técnica, o isolamento de leptospiras permite a identificação do sorovar causador, o que é importante nos estudos epidemiológicos, e para o desenvolvimento de vacinas contra a leptospirose equina. Em nosso relato, após o isolamento em meio semi-sólido EMJH, a cepa isolada foi utilizada para a realização do teste de virulência em modelo animal suscetível. Os animais inoculados com a cepa apresentaram sinais clínicos e patológicos da enfermidade experimental. Este resultado demonstra que a cepa isolada possui potencial para compor experimentos que visem o teste de vacinas experimentais contra a leptospirose.

Estudos anteriores demonstraram que a expressão de alguns genes das leptospiras estaria relacionada com a patogenicidade e a virulência das cepas (Verma *et al.*, 2013). Em nosso estudo, detectamos no DNA genômico da cepa isolada do feto abortado a presença de dois genes, LipL32 e LigB, os quais são amplamente utilizados em estudos de vacinologia reversa e no desenvolvimento de testes para o diagnóstico da leptospirose, e que estão presentes apenas em leptospiras patogênicas (Bharti *et al.*, 2003; Szeredi *et al.*, 2006). A amplificação de 16S rRNA (dados não mostrados) e SecY permitirá a posterior classificação genotípica da cepa isolada, uma etapa não realizada no presente relato.

Este relato descreve um caso de aborto por leptospirose em uma égua sem raça definida ocorrido no município de Pelotas, no qual foi possível o isolamento do agente e a caracterização da virulência em modelo animal e a caracterização genotípica preliminar da cepa isolada.

REFERÊNCIAS

BHART, A. R.; NALLY, E. J.; RICALDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; LEVETT, P. N.; GILMAN, R.H.; WILLIG, M. R.; GOTUZZO, E.; and VINETZ, J. M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet Infectious Diseases*, v.3, p.757–71, 2003.

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

FINGER, M.A.; BARROS FILHO, I.R.; LEUTENEGGER, C.; ESTRADA, M.; ULLMANN, L.S.; LANGONI, H.; KIKUTI, M.; DORNBUSH, P.T.; DECONTO, I. & BIONDO, A.W. 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.473-6, 2014.

FREITAS, D.C.; LACERDA, J.P.G.; SALLES GOMES, C.E.; LIMA, F.P. Notas sobre leptospirose equina. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.27, p.93-6, 1960.

HAMOND, C.; MARTINS, G.; MEDEIROS, M. A.; LILENBAUM, W. Presence of Leptospiral DNA in Semen Suggests Venereal Transmission in Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.33, p.1157-1159, 2013.

HARTSKEERL, R.A.; GORIS, M.G.A.; BREM, S.; MEYER, P.; KOPP, H.; GERHARDS, H.; WOLLANKE, B. Classification of *Leptospira* from the Eyes of Horses Suffering from Recurrent Uveitis. *Journal of Veterinary Medicine B*, v.51, p.110–115, 2004.

LASTA, C. S.; OLIVEIRA, S. T.; MERINI, L. P.; DASSO, M. G.; PEDRALLI, V.; GONZÁLEZ, F. H. D. 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.

MARCOLONGO-PEREIRA, C.; ADRIEN, M.L.; LADEIRA, S.R.L.; SOARES, M.P.; ASSIS-BRASIL, N.D, & SCHILD, A.L. Abortos em equinos a região Sul do Rio Grande do Sul: estudo de 72 casos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* v.32, n.1, p.22-26, 2012.

PESCADOR, C.A.; CORBELLINI, L.G.; LORETTI, A.P.; WUNDER-JUNIOR, E.; FRANTZ, F.J.; DRIEMEIER, D. Aborto equino por *Leptospira* sp. *Ciência Rural*, v.34, n.1, p.271-274, 2004.

SZEREDI, L. and HAAKE, D. A. Immunohistochemical Identification and Pathologic Findings in Natural Cases of Equine Abortion Caused by Leptospiral Infection. *Veterinary Pathology*, v.43, n.5, p.755–761, 2006.

VERMA A.; STEVENSON B.; ADLER, B. Leptospirosis in horses. *Veterinary Microbiology*, v.167, p.61–66, 2013.

YASUDA, P.H.; SULZER, C.R.; GIORGI, W.; SOARES, M.E.G. *Leptospira biflexa* sorotipo ranarum isolado de feto abortado de equino. *Revista de Microbiologia*, v.17, n.1, p.25-7, 1986.

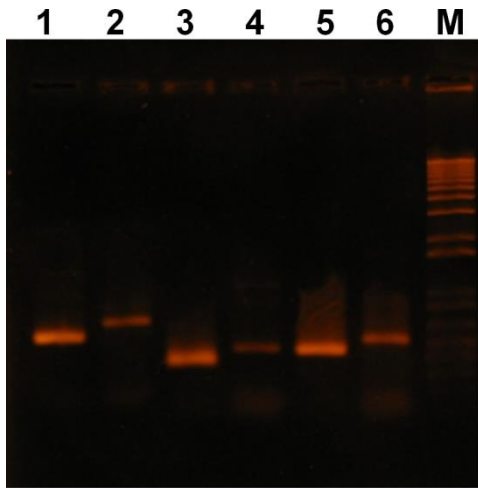


Figura 1. Amplificação dos genes SecY, LigB e LipL32 no DNA genômico da cepa isolada do feto equino e na cepa Fiocruz L1-130 (controle positivo), onde: (M) marcador de peso molecular 1kb plus DNA ladder (Invitrogen®); (1) Amplificação de SecY na cepa L1-130; (2) amplificação de SecY na cepa feto; (3) amplificação de LigB na cepa L1-130; (4) amplificação de LigB na cepa feto; (5) amplificação de LipL32 na cepa L1-130; (6) amplificação de LipL32 na cepa feto.

5 Considerações Finais

- A prevalência de anticorpos anti-*Leptospira*, com títulos maiores ou iguais a 100, nos equinos estudados é de 89,9%. O sorovar mais prevalente é o Hardjo (cepa Hardjoprajitno), seguido por dois isolados locais, a cepa Kito (sorogrupo Canicola) e a cepa 4E (sorogrupo Ballum), com os títulos variando de 50 a 800 em todas as reações;

- Dentre os fatores de risco analisados através da análise univariada, a associação entre os animais que pastam em campo nativo e a sororeatividade no MAT, revela ser um risco aos animais com $p=0,02$. Quanto a existência de episódios de aborto nas éguas do estudo, a associação entre as propriedades que relatam aborto e os animais que pastam em campo nativo ($p<0,001$), com a presença de galpão para o armazenamento de ração para os animais ($p=0,03$), com a utilização de monta natural ($p<0,001$) e a presença de roedores na propriedade ($p<0,001$), também revelam risco aos animais do estudo. Como fator de proteção ao aborto, destaca-se o armazenamento de ração em tonel ($p<0,01$);

- Este estudo descreve o primeiro relato de ERU causada por leptospiroses em equinos da raça crioula no Brasil;

- A cepa isolada do feto equino abortado, durante este estudo, é patogênica e virulenta para hamsters, a qual poderá ser utilizada em estudos que visem o teste de vacinas contra a leptospirose.

Referências

ADLER, B.; MOCTEZUMA, A. P. Leptospira and Leptospirosis. **Vet Microbiol.** 2009.

ADLER, B.; MOCTEZUMA, A. P. Leptospira, In: GYLES, G. L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, G.; THOEN, C. O. **Pathogenesis of bacterial infections in animals.** 4th Ed. Iowa: Blackwell Publishing, p. 527-547, 2010b.

ADLER, B. History Of Leptospirosis and Leptospira. **Current Topics in Microbiology and Immunology.** Vol. 387, 2015.

ALI, H., SAEID, S. Seroprevalence of leptospiral infection in horses, donkeys and mules 356 in East Azerbaijan province. **Afr J Microbiol Res**, v.6, n.20, p.4384-87, 2012.

ARENT, Z.; GILMORE, C.; BREM, S.; Ellis, W.A. Molecular studies on European equine isolates of *Leptospira interrogans* serovars Bratislava and Muenchen. *Infection, Genetics and Evolution.*v.34, p.26–31, 2015.

ÁVILA, M. O., FURTADO, L. R. I., TEIXEIRA, M. M., ROSADO, R. L. I., MARTINS, L.F.S., BROD, C.S. Aglutininas anti-leptospíricas em cães na área de influência do centro de controle de zoonoses, Pelotas, RS, Brasil, no ano de 1995. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 28, n. 1, p. 107-110, 1998.

BARWICK, R. S., MOHAMMED, H. O., McDONOUGH, P. L. & WHITE, M. E. Risk factors associated with the likelihood of Leptospiral seropositivity in horses in the state of New York. *Am. J. Vet. Res*, v.58, p.1097-1103, 1997.

BAVERUD, V.; GUNNARSSON, A.; ENGVALL, E.O.; FRAZÉN, P. EGENVALL, A. *Leptospira* seroprevalence and association between seropositivity, clinical disease and host factors in horses. **Acta Veterinaria Scandinavica.**v.51, n.15, 2009.

BEER, J. Doenças infecciosas em animais domésticos. São Paulo: **Roca**, p.394, 1999.

BHARTI, A.R., NALLY, J.E., RICARDI, J.N., MATTHIAS, M.A., DIAZ, M.M., LOVETT, M.A., LEVETT, P.N., GILMAN, R.H., WILLIG, M.R., GOTUZZO, E., VINETZ, J.M., Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infect Dis**, V.3, p.757 - 71, 2003.

BOLIN, C. A. Diagnosis of Leptospirosis: A re-emerging disease of companion animals. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery Small Animal**, v.11, p.166-171, 1996.

BRAGA, J.; HAMOND, C.; MARTINS, G.; ABREU, R.N.; LILENBAUM, W. Ophthalmic alterations in horses with leptospirosis by serovar icterohaemorrhagiae in Rio de Janeiro, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.31, n.2, p.147-150, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Equídeos. Brasília: **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, 2013.

CORRÊA, M.O.; NETO, V.A.; VERONESI, R.; FABRI, S.OA. Leptospiroses em eqüinos: inquérito sorológico. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 19, n. 2, p. 186-193, 1957.

DAHER, E.F.; ABREU, K.L.S.; SILVA JUNIOR, G.B. Leptospirosis-associated acute kidney injury. **Journal of Brazilian Nephrology**. v.4, n.43, p.400-407, 2010.

DIVERS, T.J.; CHANG, Y. Leptospirosis, In: ROBINSON, N.E.; SPRAYBERRY, K.A. (Ed). Current therapy in equine medicine. 6 th Ed. St.Louis: **Elsevier**, p.145-147, 2009.

EBANI, V., BERTELLONI, F., PINZAUTI, P., CERRI, D. Seroprevalence of *Leptospira* spp. and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Italian horses. **Ann. Agric. Environ. Med**, V.27, p.237–240, 2012.

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

FAINE, S., editors et al..*Leptospira and Leptospirosis*.Melbourne, Australia, **MediScied**; 1999.

FINGER, M.A.; BARROS FILHO, I.R.; LEUTENEGGER, C.; ESTRADA, M.; ULLMANN, L.S.; LANGONI, H.; KIKUTI, M.; DORNBUSH, P.T.; DECONTO, I. &

BIONDO, A.W. 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.473-6, 2014.

FREITAS, D.C.; LACERDA, J.P.G.; SALLES GOMES, C.E.; LIMA, F.P. Notas sobre leptospirose equina. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.27, p.93-6, 1960.

GERDING, J.C.; GILGER, G.C. Prognosis and impact of equine recurrent uveitis. **Equine Veterinary Journal**.v.48, p.290–298, 2016.

GILGER, B. C. Equine Recurrent uveitis. In: Robinson, N. E. **Current therapy in equine medicine**. Saunders, p.468-472,2003.

HAMOND, C.; MARTINS, G.; MEDEIROS, M. A.; LILENBAUM, W. Presence of Leptospiral DNA in Semen Suggests Venereal Transmission in Horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.33, p.1157-1159, 2013.

HAMOND, C.; MARTINS, G.; LAWSON-FERREIRA, R.; MEDEIROS, M.A.; LILENBAUM, W. The role of horses in the transmission of leptospirosis in an urban tropical area. **Epidemiology and Infection**, v. 141, n. 1, p. 33-35, 2012.

HARTSKEERL, R.A.; GORIS, M.G.A.; BREM, S.; MEYER, P.; KOPP, H.; GERHARDS, H.; WOLLANKE, B. Classification of *Leptospira* from the Eyes of Horses Suffering from Recurrent Uveitis. **J. Vet. Med. B.**, v.51, p.110–115, 2004.

HARTSKEERL, R.A.; COLLARES-PEREIRA, M.; ELLIS, W.A. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v.17, n.4, p. 494–501, 2011.

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

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

HODGIN, E. et al. *Leptospira* abortion in horses. **J Vet Diagn Invest**, v.1, p.283-287, 1989.

HUNTER, P.; HERR, S. Leptospirosis. In: COETZER, J.A.W.; THOMSON, G.R.; TUSTIN, R.C. **Infectious diseases of Livestock**. Oxford: Oxford University, v.2, p.997-1008, 1994.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. **Patologia veterinária**. 6. ed. São Paulo: Editora Manole, p.141, 2000.

KO, A.L.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nat. Ver. Microbiol**, n.7, p.736-747, 2009.

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

LARA, MCCS.; FURMAN, K.E.; BARROS FILHO, I.R.; VILLALOBOS, E.M.C.; CUNHA, S.E.M.; DECONTO et al. Detection of antibodies against equine viral arteritis virus (Evav) and equine herpesvirus type 1 (Ehv-1) in cart horses from Curitiba and surroundings, Southern Brazil. **Arch Vet Sci**, v.11, p.11-4, 2006.

LASTA, C. S.; OLIVEIRA, S. T.; MERINI, L. P.; DASSO, M. G.; PEDRALLI, V.; GONZÁLEZ, F. H. D. 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.

LILENBAUM, W. Leptospirosis on animal reproduction: IV. Serological findings in mares from six farms in Rio de Janeiro, Brazil (1993-1996). **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, v. 35, n. 2, p. 61-63, 1998.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 1, p.296-326, 2001.

LUCAS, D. S. D.; CULLEN, P. A.; LO, M.; SRIKRAM, A.; SERMSWAN, R. W.; ADLER, B. Recombinant LipL32 and LigA from Leptospira are unable to stimulate protective immunity against leptospirosis in the hamster model. **Vaccine**, v.29, p.3413-3418, 2011.

MARCOLONGO-PEREIRA, C.; ADRIEN, M.L.; LADEIRA, S.R.L.; SOARES, M.P.; ASSIS-BRASIL, N.D.; SCHILD, A.L. Abortos em equinos na região Sul do Rio Grande do Sul: estudo de 72 casos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.31, n.1, p. 22-26, 2012.

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

MUSSO, D.; LA SCOLA, B. Laboratory diagnosis of leptospirosis: A challenge. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 46, p. 245-252, 2013.

NALLY, J.E.; MONAHAN, A.M.; MILLER, I.S.; BONILLA-SANTIAGO, R.; SOUDA, P.; WHITELEGGE, J.P. Comparative proteomic analysis of differentially expressed proteins in the urine of reservoir hosts of leptospirosis. **PLOS One**. v.6, n.10, p.1-9. out. 2011.

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

PEREZ, J.; BRESCIA, F.; BECAM, J.; MAURON, C.; GOARANT, C. Rodent abundance dynamics and leptospirosis carriage in na área of hyper-endemicity in New Caledonia. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v.5, n.10, p.1-9, 2011.

PESCADOR, C. A.; CORBELLINI, L. G.; LORETTI, A. P.; WUNDER JUNIOR, E.;FRANTZ, F. J .;DRIEMEIER, D. Aborto equino por *Leptospira* sp. **Ciência Rural**, v.34, n.1, p.271-274, 2004.

POONACHA K. B. et al. The role of *Leptospira Interrogans* serovar Pomona type Kennewicki as a cause of abortion and stillbirth in mares. In: INTERNATIONAL CONFERENCE, 1994, Tokyo, Japan. Proceedings... Tokyo: **Equine Infections disease**, v.II,p.113-119, 1994.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.G.; BLOOD, P.C.; HINCHCLIFF, K.W. **Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**. 9th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.17-37, 2002.

RISTOW, P.; LILENBAUM, W. Leptospirose: atualização e perspectivas. **Microbiologia in foco**, São Paulo, ano 3, n. 11, p. 17-27, 2010.

SANTA ROSA, C. A. Diagnóstico laboratorial das leptospiroses. **Revista Microbiológica**, v. 1, n. 2, p. 97-109, 1970.

SHARMA, M.; YADAV, A. Leptospirosis: Epidemiology, Diagnosis, and Control. **Journal of Infectious Diseases and Antimicrobial Agents**, Bangkok, v. 25, n. 2, p. 93- 103, 2008.

SILVA, É.F.; SANTOS, C.S.; ATHANAZIO, D.A.; SEYFFERT, N.; SEIXAS, F.K.; CERQUEIRA, G.M.; FAGUNDES, M.Q.; BROD, C.S.; REIS, M.G.; DELLAGOSTIN, O.A.; KO, A.I. Characterization of virulence of *Leptospira* isolates in a hamster model. **Vaccine**, v.26, p.3892-3896, 2008.

SILVA, É. F., FÉLIX, S. R., CERQUEIRA, G. M., FAGUNDES, M. Q., NETO, A. C. P. S., GRASSMANN, A. A., DELLAGOSTIN, O. A. Short Report : Preliminary Characterization of *Mus musculus* – **Derived Pathogenic Strains of *Leptospira borgpetersenii* Serogroup Ballum in a Hamster Model**, 83(2), 336–337, 2010.

SOUSA, C.A.T. **Análise Crítica do Sistema de Macro drenagem do Santa Bárbara – Pelotas/RS** 84f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização programa de Pós-Graduação Curso Gestores Regionais de Recursos Hídricos) - Faculdade de Engenharia Agrícola Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS, 2008.

STIMSON, A.M. Note on a organism found in yellow-fever tissue. **Public Health Reports**, Washington, v.22, n. 18, p. 541, 1907.

STODDARD, R.A.; GEEA, J.E.; WILKINSA, P.P.;MCCAUSTLANDB, K.; HOFFMASTERA, A.R. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**. v. 64, p.247-55, 2009.

SZEREDI, L. and HAAKE, D. A. Immunohistochemical Identification and Pathologic Findings in Natural Cases of Equine Abortion Caused by Leptospiral Infection. **Veterinary Pathology**, v.43, n.5, p.755–761, 2006.

TADICH, T. A.; TAPIA, C.; GONZALEZ, D. Seroprevalence of *Leptospira* spp. in working horses located in the central region of Chile. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.38, p.14-18, 2016.

VASCONCELOS, C.H.; FONSECA, F.R.; LISE, M.L.Z.; ARSKY, M.L.N.S. Fatores ambientais e socioeconômicos relacionados à distribuição de casos de leptospirose

no Estado de Pernambuco, Brasil, 2001–2009. **Cadernos Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 1, p.49-56, 2012.

VERMA A.; KUMAR P.; BABB K.; TIMONEY J.F.; STEVENSON B. Cross-Reactivity of Antibodies against Leptospiral Recurrent Uveitis-Associated Proteins A and B (LruA and LruB) with Eye Proteins. **PLOS Neglected Tropical Diseases** 4(8): e778, 2010.

VERMA A.; STEVENSON B. Leptospiral Uveitis – There Is More to It Than Meets the Eye! **Zoonoses Public Health** 59 (Suppl. 2).p.132–141, 2012.

VERMA, A., STEVENSON, B., ADLER, B. Leptospirosis in horses. **Vet Microbiol**, v.339, n.167, p.61-66, 2013.

YASUDA, P.H.; SULZER, C.R.; GIORGI, W.; SOARES, M.E.G. *Leptospira biflexa* sorotipo ranarum isolado de feto abortado de equino. **Revista de Microbiologia**, v.17, n.1, p.25-7, 1986.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Internation Leptospirosis Society. Human Leptospirosis: **Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control**. Geneva, Switzerland: WHO; 2003.

Anexos

ANEXO I



Pelotas, 10 de agosto de 2015

De: M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEE A)

Para: Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

Departamento de Veterinária Preventiva – Faculdade de Veterinária

Senhor Professor:

A *CEE A* analisou o projeto intitulado: “**Estudo transversal da leptospirose em equinos do município de Pelotas/RS**”, processo nº23110.004637/2015-18 que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, Subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, pois está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEE A.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao *COBALTO* para posterior registro no *COCEPE* (código para cadastro nº **CEE A 4637-2015**).

Vigência do Projeto: 10/08/2015 a 31/12/2020

Espécie/Linhagem: *Equus caballus* e *Mesocricetus auratus*/Golden Syrian

Nº de animais: 385 equinos e 20 hamster

Idade: variável (equinos) e 4 semanas (hamster)

Sexo: variável (equinos) e Machos (hamster)

Origem: Propriedades particulares (equinos) e Biotério Central/UFPEL (hamster)

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da CEE A

Ciente em: ____/____/2015

Assinatura do Professor Responsável: _____

Anexo II

Questionário Epidemiológico Sobre Leptospirose Animal

Variável	Prompt
1. Número Questionário	NQUES
2. Entrevistador:	ENTREV
3. Data entrevista: __/__/__	DTENT
4. Nome do Proprietário	NOME
5. Endereço:	END
6. Bairro/localidade:	BAIRR
7. Referência (rural)	REF
8. Telefone:	TEL
9. Data de nascimento __/__/__	DTNASC
10. Idade __ anos	IDADE
11. Sexo:(1) Masculino (2) Feminino	SEXO
12. Na sua casa tem:	
Bovinos ? (1) Sim(2) Não	BOV
Equinos ? (1) Sim(2) Não	EQUI
Ovinos ? (1) Sim(2) Não	OVI
Suínos ? (1) Sim(2) Não	SUI
Cães ? (1) Sim(2) Não	CAO
Gatos ? (1) Sim(2) Não	GATO
Outras? Quais?	
13. Há presença de roedores na propriedade? (1) Sim (2) não	ROEDOR
14. É realizado o controle de roedores? (1) Sim (2) não	CONROE
15. Os roedores tem acesso aos alimentos dos animais? (1) Sim (2) não	ALIMROE
16. Qual é a fonte de água para os animais? (1) encanada (2) poço (3) açude (4) arroio (5) sanga (6) banhado (7) outro	FONTAGU
17. Qual a alimentação dos animais? (1) campo nativo (2) pastagem (3) ração (4) milho (5) silagem (6) feno (7) sal	ALIANIM
18. Onde são armazenados os alimentos? (1) galpão (2) sala separada (3) dentro de casa (4) bombona (5) Tonel (6) outro? Qual?	ARMAZ
19. Os animais (em geral) tem acesso ao local de armazenamento? (1) Sim (2) Não	ANARMAZ
20. Qual a topografia da sua propriedade? (1) alto (2) baixo (3) misto	TOPO
21. Qual a umidade do solo nos piquetes dos animais? (1) seco (2) úmido	UMISOL
23. Onde os animais permanecem a noite? (1) estábulo (2) mangueira (3) campo (4) piquete	ANINOIT
24. Este local é úmido? (1) sim (2) não	LOCUMI
25. Os animais são vacinados contra a leptospirose? (1) Sim (2) Não Se sim, qual a vacina?	VACLEP
26. Qual o sistema de reprodução dos animais? (1) monta natural (2) inseminação (3) ambos	SISREP
27. Tem aborto na propriedade? (1) sim (2) não	ABORTO
28. Natimortos? (1) Sim (2) Não	NATI
29. Retorno ao cio? (1) Sim (2) Não	CIO
30. Manifestações clínicas (1) icterícia (2) hemorragia (3) manifestações oculares (4) anemia (5) perda de peso (6) anorexia (7) diminuição na lactação (8) outros	MANCLIN