

DEISE KELI FARIAS

**ASPECTOS SOROEPIDEMIOLÓGICOS E LABORATORIAIS DA
LEPTOSPIROSE EM EQUINOS**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina- UDESC, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mere Erika Saito

Coorientador: Prof. Dr. Álvaro Menin

LAGES – SC

2019

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Farias, Deise Keli

Aspectos soroepidemiológicos e laboratoriais da leptospirose
em equinos / Deise Keli Farias. -- 2019.

57 p.

Orientadora: Mere Erika Saito

Coorientador: Álvaro Menin

Tese (doutorado) -- Universidade do Estado de Santa Catarina,
Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação
em Ciência Animal, Lages, 2019.

1. Saúde pública . 2. Doenças infecciosas . 3. Medicina
Veterinária preventiva . 4. Metabolismo oxidativo . I. Saito, Mere
Erika. II. Menin, Álvaro . III. Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de
Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título.

DEISE KELI FARIAS

**ASPECTOS SOROEPIDEMIOLÓGICOS E LABORATORIAIS DA
LEPTOSPIROSE EM EQUINOS**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Ciência Animal da Universidade do estado de Santa Catarina – UDESC, como requisito parcial para obtenção do título de
Doutor em Ciência Animal

Banca Examinadora:

Orientadora:

Mere Erika Saito

Dr^a. Mere Erika Saito
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

Membro:

Letícia Andrezawa

Dr^a. Letícia Andrezawa Yonezawa
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

Membro:

Luciana Pereira Machado

Dr^a. Luciana Pereira Machado
Universidade Federal da Fronteira Sul-UFFS

Membro:

Cristina Perito Cardoso

Dr^a. Cristina Perito Cardoso
CIDASC – Lages/SC

Membro:

Julieta Volpato

Dr^a. Julieta Volpato
Centro Universitário Unifacvest – Lages/SC

Lages 29 de maio de 2019.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer a Deus e a minha família, que são a base de tudo que acredito e que me dão força e motivação para meus propósitos na vida.

À minha orientadora, Dra. Mere Erika Saito, por prontamente aceitar meu pedido de orientação. Pelo auxílio em todas as fases do experimento e da tese. Agradeço pelo voto de confiança.

Ao meu coorientador, Dr. Álvaro Menin, por todo o auxílio na execução das análises, direcionamento da pesquisa e por aguentar minha ansiedade.

Ao Dr. André Thaler Neto, que mais uma vez, me salvou com a estatística. Embora, sempre muito sobrecarregado, sempre disponibiliza um tempo para ajudar a todos que precisam.

Ao Laboratório VERTÁ e à Dra Carolina Reck, pela prestatividade, pelas amostras cedidas e toda a sorologia realizada.

Ao Msc. Silvério Bunn, pelo auxílio na execução do projeto, contato dos proprietários, para que fosse possível a visita nas propriedades e coleta das amostras.

À Gabriela Dick e a equipe do Laboratório de Controle de Doenças dos Animais da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, que realizaram parte da sorologia.

À toda equipe do Laboratório Clínico Veterinário da UDESC, pela realização de todas as análises sanguíneas, em especial a Mariângela Lovatel e a Ana Cristina Dalmina pela prestatividade, e auxílio nas análises. À Julieta Volpato, Carlos Czpak Kroetz, Paulo Ricardo Benetti Todeschini, Maysa Garlet e Carla Dezan Cancelier, pela parceria e toda a ajuda disponibilizada. O trabalho em laboratório foi uma experiência nova, mas com a ajuda da equipe que é muito unida e entrosada, ficou mais fácil e divertido.

Ao Dr. Luiz Cláudio Milette responsável pelo setor de Bioquímica da UDESC, por gentilmente ceder os equipamentos e estrutura para a realização de algumas das dosagens realizadas nesta pesquisa.

Aos proprietários que gentilmente aceitaram participar deste estudo, cedendo seus animais. E em especial, aos equinos.

Obrigada!

RESUMO

FARIAS, D.K. Aspectos soroepidemiológicos e laboratoriais da leptospirose em equinos. 2019. 57 p. Tese (Doutorado) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Doutorado em Ciência Animal, Lages, 2019.

A leptospirose é uma doença infectocontagiosa que acomete os animais domésticos, selvagens e o homem, sendo considerada uma zoonose, com grande impacto na saúde pública mundial. A infecção é causada pela *Leptospira* spp., por representantes do sorogrupo *Leptospira interrogans* (*L. interrogans*). Os equinos podem atuar como reservatórios dessa bactéria, disseminando o agente principalmente pela urina. Clinicamente, a infecção pode se apresentar de forma aguda ou inaparente, causando abortamentos, uveíte recorrente e nascimento de potros debilitados. A inespecificidade clínica dificulta o diagnóstico diferencial e possivelmente traduz o subdiagnóstico da infecção. Além disso, as rotinas de diagnóstico sorológico geralmente contemplam apenas sorogrupo clássicos ou vacinais. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi realizar um estudo soroepidemiológico para os principais sorogrupo de *Leptospira* spp. circulantes no rebanho de equinos de Santa Catarina e avaliar aspectos da patologia clínica (hematologia, bioquímica, fragilidade osmótica e marcadores de metabolismo oxidativo) em animais positivos para leptospirose. Para tal, amostras de sangue das cinco mesorregiões do estado, considerando proporcionalmente a concentração de animais nas mesmas, foram submetidas à análise sorológica por meio do ensaio de soroaglutinação microscópica (MAT), conforme recomendação da Organização Internacional de Epizootias (OIE). Na região Serrana de Santa Catarina foram colhidas amostras de animais sem sintomatologia ou histórico de doença recente, não vacinados, sendo estas amostras submetidas à sorologia para sorovares não convencionais e avaliação de parâmetros hematológicos e bioquímicos. Foram avaliados também os fatores de risco relacionados a doença. Para os animais com histórico de distúrbios reprodutivos foi observada uma prevalência de 22,6% (248/1095) das amostras coletadas, sendo os sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* (24%), *Grippotyphosa* (20,90%) e *Canicola* (15,70%) os mais prevalentes. Já nos animais da região Serrana, verificou-se uma prevalência de 45,4% (94/207), sendo os sorovares *Bratislava* 16,9% (35/207), *Icterohaemorrhagiae* 10,6% (22/207) e *Grippotyphosa* 5,31% (11/207) com maior frequência. Demonstrou-se que podem estar relacionados a leptospirose fatores de risco como: sistema de criação (OR=1,27; $p<0,05$), histórico de doença (OR=2,56; $p<0,01$) e presença de outras espécies animais na propriedade. As avaliações hematológicas e bioquímicas mostraram que animais positivos para *Leptospira* spp. não apresentaram prejuízos sistêmicos capazes de serem detectados em exames sanguíneos de rotina. Com base nos achados deste trabalho, podemos concluir que, apesar da alta prevalência da infecção e circulação de sorovares não convencionais nos rebanhos de equinos, a leptospirose é uma doença infectocontagiosa complexa, de difícil diagnóstico e controle, uma vez que se mantém de forma subclínica e encontra uma grande diversidade de reservatórios na natureza. Além disso, a ausência de medidas específicas de controle da infecção remete a sua importância para a saúde pública.

Palavras-chave: Saúde Pública. Doenças Infecciosas. Medicina Veterinária Preventiva.

ABSTRACT

FARIAS, D.K. Seroepidemiological and laboratory aspects of leptospirosis in horses. 2019. 57 p. Tese (Doutorado) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Doutorado em Ciência Animal, Lages, 2019.

Leptospirosis is an infectious disease that affects domestic animals, wild animals and human, considered a zoonosis, with impact on the world public health. The infection is caused by *Leptospira* spp., by representatives of the serogroup *Leptospira interrogans* (*L. interrogans*). Equines can act as reservoirs of this bacterium, disseminating the agent mainly through the urine. Clinically, the infection may present acute or unapparent, causing abortion, recurrent uveitis, and birth of weakened foals. Clinical non-specificity makes differential diagnosis difficult and possibly translates into underdiagnosis of infection. In addition, the serological diagnostic routines generally only contemplate classic or vaccine serogroups. In this context, the objective of the present study was to perform a seroepidemiological study for the main serogroups of *Leptospira* spp. (hematology, biochemistry, osmotic fragility and markers of oxidative metabolism) in non - vaccinated animals. Blood samples from the five mesoregions of the state, proportionally considering the concentration of animals in them, were submitted to serological analysis through the microscopic serum agglutination test (MAT), as recommended by the International Organization of Epizootics (OIE). In the Serrana region of Santa Catarina, non-vaccinated healthy animal samples were collected, and these samples were submitted to serology for non-conventional serovars and evaluation of hematological and biochemical parameters. Risk factors related to the disease were evaluated. For the animals with a history of reproductive disorders, a prevalence of 22.6% (248/1095) of the collected samples was observed, the serogroups *Icterohaemorrhagiae* (24%), *Grippotyphosa* (20.90%) and *Canicola* (15.70%) the most prevalent. In the non-vaccinated healthy animals of the Serrana region, a prevalence of 45.4% (94/207) was observed, with serovars *Bratislava* 16.9% (35/207), *Icterohaemorrhagiae* 10.6% (22/207) and *Grippotyphosa* 5.31% (11/207) with higher frequency. They have been shown to be related to leptospirosis, risk factors as a system of creation (OR = 1.27, $p < 0.05$), disease history (OR = 2.56, $p < 0.01$) and presence of other animal species on the farm. Hematological and biochemical evaluations showed that animals positive for *Leptospira* spp. do not present systemic damage capable of being detected in routine blood tests. Based on the findings of this study, we can conclude that in spite of the high prevalence of infection and circulation including non-conventional serovars, leptospirosis is a complex infectious contagious disease, difficult to diagnosis and control, since it remains subclinically and finds a great diversity of reservoirs in nature. In addition, the absence of specific infection control measures points to its importance for public health.

Keywords: Public Health. Infectious diseases. Preventive Veterinary Medicine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Delimitação geográfica das mesorregiões do estado de Santa Catarina e número de animais utilizados para o levantamento soroepidemiológico da <i>Leptospira</i> spp. em cada mesorregião.....	25
Figura 1 - Soropositividade das amostras de soro equino (n=207) para os diferentes sorogrupos de <i>Leptospira</i> spp. na região serrana do estado de Santa Catarina, Brasil.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Prevalência dos sorogrupos de <i>Leptospira interrogans</i> em equinos com distúrbios reprodutivos no Estado de Santa Catarina, Brasil.....	26
Tabela 1 - Análise descritiva das variáveis independentes (variáveis qualitativas) com base na variável resposta (MAT positivo ou negativo) para os animais (n=207) e propriedades (n=26) avaliados e segundo sorologia positiva para <i>Leptospira</i> spp (n=94).....	36
Tabela 2 - Fatores de risco para infecção por <i>Leptospira</i> spp. em equinos, mostrando valores de odds ratio (OR) e intervalo de confiança (IC) para equinos com sorologia positiva para <i>Leptospira</i> spp. (MAT positivo ou negativo) e infecção pelo sorogrupos <i>L. Australis</i> (<i>Bratislava</i>) ou <i>L. Icterohaemorrhagiae</i> (<i>Copenhageni</i> e <i>Icterohaemorrhagiae</i>).....	37
Tabela 1 - Valores médios \pm desvio padrão do eritrograma conforme sorologia positiva e negativa para <i>Leptospira</i> spp. e separadamente pelos sorovares de maior prevalência.....	47
Tabela 2 - Valores médios \pm desvio padrão do leucograma conforme sorologia positiva e negativa para <i>Leptospira</i> spp. e separadamente pelos sorovares de maior prevalência.....	48
Tabela 3 - Valores de proteína plasmática total e fibrinogênio conforme sorologia positiva e negativa para <i>Leptospira</i> spp. e separadamente pelos sorovares de maior prevalência.....	48
Tabela 4 - Valores médios \pm desvio padrão expresso como H50, correspondente à concentração de NaCl com 50% (H50) de hemólise conforme sorologia positiva e negativa para <i>Leptospira</i> spp. e separadamente pelos sorovares de maior prevalência.....	49
Tabela 5 - Valores médios \pm desvio padrão de glutationa reduzida eritrocitária (GSH) e malondialdeído (MDA) conforme sorologia positiva e negativa para <i>Leptospira</i> spp. e separadamente pelos sorovares de maior prevalência.....	49
Tabela 6 - Valores médios \pm desvio padrão de bioquímica clínica conforme sorologia positiva e negativa para <i>Leptospira</i> spp. e separadamente pelos sorovares de maior prevalência.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – Análise de variância
AST - Aspartato aminotransferase
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CHGM – Concentração de hemoglobina globular média
CONCEA – Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal
EDTA - Ácido Etilenodiaminotetracético
ERO – Espécies reativas ao oxigênio
EUA – Estados Unidos da América
FA – Fosfatase alcalina
FOE – Fragilidade osmótica eritrocitária
GGT - Gama glutamiltransferase
GSH – Glutationa reduzida
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
MAT – Teste de aglutinação microscópica
MDA – Malondialdeído
NaCl – Cloreto de sódio
OIE – Organização Internacional de Epizootias
OR – Odds Ratio
PPT – Proteína plasmática total
PST – Proteína total sérica
RJ – Rio de Janeiro
SC – Santa Catarina
TBA – Ácido tiobarbitúrico
UDESC – Universidade do Estado de Santa Catarina
UFF – Universidade Federal Fluminense
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina
VG – Volume globular
VGM – Volume globular médio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	OBJETIVOS.....	21
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	21
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3	REFERÊNCIAS.....	21
	CAPÍTULO I.....	23
	ARTIGO I: PRESENÇA DE ANTICORPOS ANTI- <i>Leptospira</i> spp. EM EQUINOS COM HISTÓRICO DE SINAIS CLÍNICOS REPRODUTIVOS NO ESTADO DE SANTA CATARINA.....	23
1	INTRODUÇÃO.....	23
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3	RESULTADOS.....	26
4	DISCUSSÃO.....	27
5	CONCLUSÃO.....	28
6	REFERÊNCIAS.....	28
	CAPÍTULO II.....	31
	ARTIGO II: FATORES DE RISCO RELACIONADOS A SOROPOSITIVIDADE PARA <i>Leptospira</i> spp. EM EQUINOS.....	31
1	INTRODUÇÃO.....	31
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
2.1	Animais e amostras.....	32
2.2	Teste sorológico.....	33
2.3	Dados epidemiológicos.....	33
2.4	Análise estatística.....	34
3	RESULTADOS.....	34
4	DISCUSSÃO.....	37
5	CONCLUSÃO.....	39
6	REFERÊNCIAS.....	40
	CAPÍTULO III.....	43
	ARTIGO III: EXAMES LABORATORIAIS EM EQUINOS SOROPOSITIVOS PARA <i>Leptospira</i> spp. E SEM SINAIS DE DOENÇA CLÍNICA.....	43
1	INTRODUÇÃO.....	43
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	45
2.1	Animais e amostras.....	45
2.2	Teste sorológico.....	45
2.3	Hemograma.....	45
2.4	Proteína plasmática total e fibrinogênio.....	45
2.5	Fragilidade osmótica.....	46
2.6	Metabolismo oxidativo.....	46
2.7	Bioquímica clínica.....	46

2.8	Análise estatística.....	46
3	RESULTADOS.....	47
4	DISCUSSÃO.....	50
5	CONCLUSÃO.....	53
6	REFERÊNCIAS.....	53
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença infectocontagiosa que acomete os animais domésticos, selvagens e o homem, sendo considerada uma importante zoonose, com grande impacto na saúde pública mundial, causada pela infecção por representantes do gênero *Leptospira* spp. (VERMA et al., 2013).

O gênero *Leptospira* pertence à ordem Spirochaetales, família Leptospiraceae. O gênero *Leptospira* foi agrupado em 13 espécies patogênicas e seis espécies saprófitas (não patogênicas). Dentre as espécies patogênicas são reconhecidos 25 sorogrupos e aproximadamente 300 sorovares, sendo que a maioria dos sorovares patogênicos estão incluídos em três espécies principais: *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* e *L. kirschner* (LEVETT, 2001; BHARTI et al., 2003; ADLER e DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

As leptospiras sobrevivem no ambiente em condições favoráveis de pH (7,0 a 7,4), temperatura (10-30°C) e umidade (FAINE et al., 2000). Períodos com elevados índices de precipitações pluviométricas associados a uma variedade de espécies hospedeiras que facilitem a cadeia de transmissão do patógeno podem resultar em surtos epidêmicos devido à maior exposição à água contaminada com urina ou tecidos provenientes de animais infectados (LEVETT, 2001).

Dentre as enfermidades que afetam economicamente a criação de equinos, a leptospirose toma destaque por ser uma infecção de caráter zoonótico, emergente em várias regiões do mundo e de fácil disseminação (HARTSKEERL et al., 2011). A verdadeira extensão e incidência da leptospirose não são totalmente conhecidas, pois os sistemas de vigilância são altamente variáveis, muitas vezes ineficientes ou até mesmo inexistentes.

Quando nos referimos aos animais de criação extensiva, estes também apresentam grande importância, pois são potenciais reservatórios da doença, servindo de hospedeiro de manutenção e, consequentemente, fonte de infecção para outras espécies animais. O agente pode ser eliminado no ambiente via urina, sêmen, descarga vaginal pós-abortamento, fetos abortados, placenta, sangue e leite (ELLIS, 2015). Quanto ao ambiente silvestre, estudos têm mostrado diversos animais selvagens com anticorpos anti-*Leptospira* spp., o que contribui para a permanência da infecção neste ciclo (MARCHIORI FILHO, 2002; LANGONI et al., 2016). Sendo assim, uma investigação adequada para identificar os sorovares circulantes é fundamental para orientar os programas de controle da infecção, uma vez que as vacinas utilizadas na imunoprofilaxia em equinos contemplam somente alguns sorovares de *Leptospira*.

spp. Contudo, o possível subdiagnóstico da leptospirose, envolvendo sorovares não clássicos, torna subestimado o número de casos.

A imunidade à leptospirose é amplamente humoral, e é sorovar específica. Assim, a imunização protege contra a doença causada pelo sorovar homólogo ou sorovares antigenicamente semelhantes, apenas. As vacinas devem, portanto, conter sorovares representativos daqueles presentes na população a ser imunizada (Martins *et al.*, 2017). É imprescindível, portanto, ter conhecimento dos sorovares da população a ser vacinada, para um efetivo funcionamento da vacina.

Trabalhos realizados em diferentes regiões do Brasil, mostram grande variação quanto à soroprevalência de sorovares em equinos e outras espécies animais (CASELANI, 2012; LASTA *et al.*, 2013; FINGER *et al.*, 2014). Para o estado de Santa Catarina pesquisas relatando a prevalência do agente no rebanho equino são escassas. Neste contexto, por se tratar de um agente infeccioso de potencial zoonótico, com alto impacto na sanidade animal, na saúde ambiental e na saúde pública, o conhecimento da epidemiologia e dos principais aspectos clínicos da infecção por *Leptospira* spp. é de grande importância, uma vez que fornece subsídios para estratégias efetivas de prevenção e controle.

A tese será apresentada em forma de capítulos. Os próximos capítulos estarão em formato de artigo, e correspondem às futuras publicações desta pesquisa. O primeiro artigo compreende os achados obtidos a partir da análise soroepidemiológica, da infecção por *Leptospira* spp. em amostras de soro de equinos de diferentes regiões do estado de Santa Catarina. O segundo e terceiro artigos foram realizados a partir das coletas de dados efetuadas na região Serrana de Santa Catarina. Os dados foram divididos em fatores de risco para leptospirose e exames laboratoriais complementares.

Este trabalho está de acordo com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e foi previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais pela Universidade do Estado de Santa Catarina (CEUA/UDESC), protocolado sob o CEUA nº 4299250816.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar um estudo soroepidemiológico da infecção por *Leptospira* spp. no rebanho de equinos no estado de Santa Catarina e estudar aspectos laboratoriais de animais infectados, não vacinados, da região Serrana do estado de Santa Catarina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estimar a soroprevalência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. no rebanho de equinos no estado de Santa Catarina;
- Identificar os sorovares mais frequentes no estado de Santa Catarina;
- Avaliar e identificar os fatores de risco associados à circulação dos diferentes sorovares;
- Avaliar o metabolismo oxidativo eritrocitário e relacionar com os achados laboratoriais primários de animais soropositivos;

3 REFERÊNCIAS

ADLER, B.; DE LA PENA MOCTEZUMA, A. *Leptospira and leptospirosis*. **Vet Microbiol**, v. 140, n. 3-4, p. 287-96, Jan 27 2010.

BHARTI, A. R. et al. *Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance*. **Lancet Infect Dis**, v. 3, n. 12, p. 757-71, Dec 2003.

CASELANI, K. E. A. Estudo soroepidemiológico 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*. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 387, p. 99-137, 2015.

FAINE, S. et al. **Leptospira and Leptospirosis**. *Leptospira and Leptospirosis*. MEDSCI. Melbourne, Austrália: MedSci: 272 p. 2000.

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, p. 473-476, 2014.

HARTSKEERL, R. A.; COLLARES-PEREIRA, M.; ELLIS, W. A. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. **Clin Microbiol Infect**, v. 17, n. 4, p. 494-501, Apr 2011.

LANGONI, H. et al. Anti-leptospirosis agglutinins in Brazilian capybaras (*hydrochoerus hydrochaeris*). **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**, v. 22, p. 4, 2016.

LASTA, C. S. 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.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical microbiology reviews**, v. 14, n. 2, p. 326, 2001.

MARCHIORI FILHO, M. Estudo sorológico para leptospirose em populações de diferentes grupos genéticos de javalis (*sus scrofa scrofa*, linnaeus, 1758) dos estados de São Paulo e Paraná. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, n. 3, p. 9-15, 2002.

MARTINS, M. et al. Humoral response in naturally exposed horses after leptospiral vaccination. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 57, p. 5, 2017.

VERMA, A.; STEVENSON, B.; ADLER, B. Leptospirosis in horses. **Vet Microbiol**, v. 167, n. 1-2, p. 61-6, Nov 29 2013.

CAPÍTULO I

ARTIGO I: PRESENÇA DE ANTICORPOS ANTI-*Leptospira* spp. EM EQUINOS COM HISTÓRICO DE SINAIS CLÍNICOS REPRODUTIVOS NO ESTADO DE SANTA CATARINA

Resumo

A leptospirose é uma zoonose de importância mundial. Em equinos, a infecção por *Leptospira* spp. apesar de ser frequentemente assintomática, pode causar uveíte, abortos e natimortos. Diferentes sorovares de *Leptospira* spp. podem estar envolvidos com o quadro clínico e sua prevalência pode variar de acordo com a região. O objetivo deste estudo foi determinar a prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em equinos com distúrbios reprodutivos clínicos, no estado de Santa Catarina, Brasil. Foram avaliadas 1095 amostras de soro de equinos com histórico de distúrbios clínicos reprodutivos de diferentes regiões do estado de Santa Catarina, sendo testadas para a presença de anticorpos anti-*Leptospira* spp. com sorovares de referência pelo teste de aglutinação microscópica (MAT). As análises foram realizadas no VERTÁ - Instituto de Pesquisa e Diagnóstico Veterinário (Curitibanos/SC). Os achados soro epidemiológicos mostraram a presença de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em 22,6% (248/1095) das amostras de soro testadas. Quando avaliada a distribuição geográfica, maior prevalência de amostras positivas foi observada para mesorregião Vale do Itajaí e Grande Florianópolis 29,3% (74/252), seguida pela mesorregião Sul do estado de Santa Catarina com 26,9% (41/152). Maior prevalência foi observada para representantes dos sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* (24%), *Grippotyphosa* (20,90%) e *Canicola* (15,70%). Os achados deste trabalho mostraram a alta frequência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. no rebanho equino do estado de Santa Catarina e consequentemente a necessidade de medidas específicas para controle e vigilância desta importante zoonose nos rebanhos de equinos.

Palavras-chave: Doenças Infecciosas. Medicina Veterinária Preventiva. Imunologia.

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma importante zoonose com distribuição mundial, causada por espécies patogênicas de *Leptospira* spp. que podem infectar humanos e uma grande variedade de espécies de animais domésticos e selvagens (FAISAL et al., 2012) . Em equinos, causa abortamento, nascimento de filhotes fracos, natimortalidade, levando a grandes perdas econômicas, além de, representar um reservatório do agente (DONAHUE et al., 1991; ELLIS, 2015; EROL et al., 2015). Problemas reprodutivos associados com a sororreatividade à leptospirose têm sido extensivamente relatados (PINNA et al., 2010; HAMOND et al., 2014; PINNA et al., 2014).

As leptospiras podem persistir no trato genital, sendo eliminadas pelo sêmen, secreções vaginais e podem ser transmitidas pela cópula ou inseminação artificial (LEVETT, 2001). Os equinos são suscetíveis a uma ampla gama de sorovares de *Leptospira* spp. A este respeito, os membros de sorogrupos *L. Pomona*, *L. Grippotyphosa*, *L. Autumnalis*, *L. Sejroe*, *L. Canicola*, *L. Ballum* e principalmente *L. Australis* e *L. Icterohaemorrhagiae* são frequentemente relatados (FINGER et al., 2014; EROL et al., 2015). A sorologia é amplamente utilizada como forma de diagnóstico e representa a maioria dos relatos (VERMA et al., 2013).

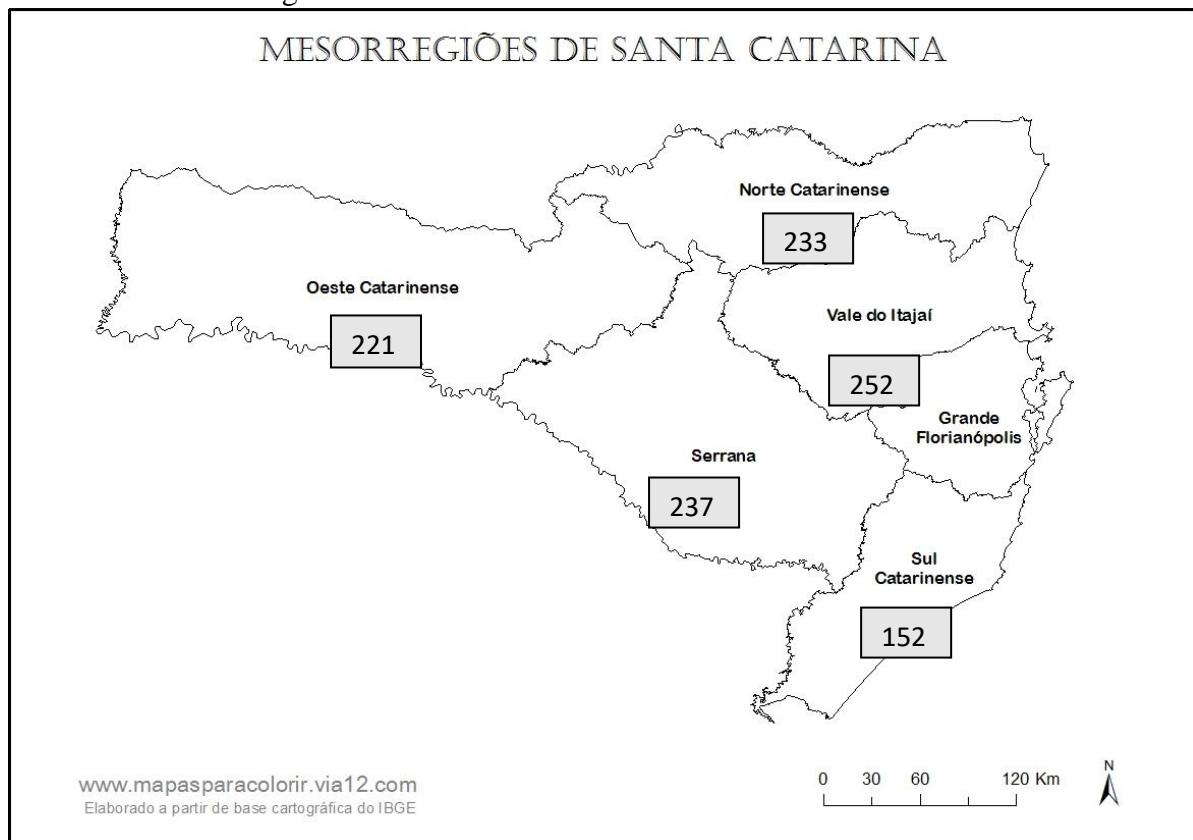
Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo realizar a detecção de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em equinos com sinais clínicos de transtorno reprodutivo no plantel de equinos de Santa Catarina. Além disso, objetivou-se identificar os principais representantes dos sorogrupos circulantes, subsidiando medidas específicas de controle dessa importante zoonose.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas 1095 amostras de soro equino nas diferentes mesorregiões do estado de Santa Catarina. As amostras eram oriundas de fêmeas adultas em idade reprodutiva. Todos os animais tinham histórico de distúrbios reprodutivos como: mortes neonatais, absorção embrionária ou abortamentos. As amostras de sangue foram colhidas por meio de venopunção da veia jugular em tubos a vácuo sem anticoagulante. Em seguida, as amostras foram transportadas devidamente resfriadas até o laboratório. Posteriormente no laboratório realizada a centrifugação e identificação, sendo o soro armazenado a -20°C.

Para o zoneamento geográfico foram consideradas cinco mesorregiões do estado de Santa Catarina (IBGE, 2017) e a população de equinos cadastrada nestas regiões, avaliando proporcionalmente a concentração de animais nas mesmas (Figura 1). A amostragem foi estimada conforme metodologia proposta por Thrusfield (1997). O cálculo foi realizado utilizando pacote estatístico Epi-Info - versão 7.1.5. (CDC, 2015), com base na estimativa do plantel total de equinos (n=112.766) para uma prevalência esperada de p<0,05.

Figura 1 - Delimitação geográfica das mesorregiões do estado de Santa Catarina e número de animais utilizados para o levantamento soroepidemiológico de *Leptospira* spp. em cada mesorregião.



Fonte: Adaptado IBGE, 2017.

As amostras foram examinadas para a presença de anticorpos anti-*Leptospira* spp. por meio do teste de aglutinação microscópica (MAT) usando antígenos vivos cultivados em meio líquido (EMJH) conforme recomendação da Organização Internacional de Epizootias (OIE, 2015). Um painel de antígenos com oito sorogrupos (12 sorovares de referência) foi usado como antígeno: *L. Australis* (*Bratislava, Australis*), *L. Bataviae* (*Bataviae*), *L. Canicola* (*Canicola*), *L. Grippotyphosa* (*Grippotyphosa*), *L. Icterohaemorrhagiae* (*Copenhageni, Icterohaemorrhagiae*), *L. Pomona* (*Pomona*), *L. Sejroe* (*Guaricura, Hardjobovis; Wolffi*), *L. Pyrogenes* (*Pyrogenes*).

Resumidamente, as suspensões antigênicas de leptospires vivas dos respectivos sorovares foram adicionadas a soro diluído em série em placas de microtitulação e incubadas. A aglutinação foi examinada usando microscopia de campo escuro (100 \times). Os títulos foram estimados como a maior diluição sérica que aglutinou pelo menos 50% das leptospires. Foram considerados animais positivos com título ≥ 200 para vacinados e ≥ 100 para animais não

vacinados. Os ensaios de MAT foram realizados no VERTÁ - Instituto de Pesquisa e Diagnóstico Veterinário, Curitibanos/SC.

3 RESULTADOS

Das 1095 amostras de soro de equinos com histórico de algum distúrbio reprodutivo avaliadas, 248 foram positivas para a presença de anticorpos anti-*Leptospira* spp., perfazendo uma prevalência estimada de 22,64% (248/1095) para os sorogrupos testados (Tabela 1).

Tabela 1 - Prevalência dos sorogrupos de *Leptospira interrogans* em equinos com distúrbios reprodutivos no estado de Santa Catarina, Brasil.

Sorogrupo	Mesorregião					
	Oeste	Norte	Serrana	Vale do Itajaí + Grande Florianópolis	Sul	Total
<i>L. Icterohaemorrhagiae</i>	6	9	16	17	12	60
<i>L. Grippotyphosa</i>	13	6	10	16	7	52
<i>L. Canicola</i>	8	4	7	11	9	39
<i>L. Pomona</i>	9	7	5	9	6	36
<i>L. Sejroe</i>	2	7	1	5	2	17
<i>L. Pyrogenes</i>	0	6	3	6	0	15
<i>L. Autumnalis</i>	9	1	0	5	0	15
<i>L. Bataviae</i>	0	0	2	2	5	9
<i>L. Australis</i>	0	1	1	3	0	5
Total reagentes	47	41	45	74	41	248
Total analisados	221	233	237	252	152	1095
Prevalência regional %	21,27	17,60	18,99	29,37	26,97	-

*foram considerados animais positivos com título ≥ 200 para vacinados e ≥ 100 para animais não vacinados
Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

A maior prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. foi observada no Vale do Itajaí e grande Florianópolis com 29,3% (74/252) e Sul do estado de Santa Catarina com 26,9% (41/152), respectivamente. Os sorogrupos de maior prevalência foram *Icterohaemorrhagiae* (24%), *Grippotyphosa* (20,90%) e *Canicola* (15,70%). Nas mesorregiões do Vale do Itajaí e Grande Florianópolis, Serrana e Sul, os sorogrupos mais prevalentes foram *Icterohaemorrhagiae*, *Grippotyphosa* e *Canicola*. No Oeste do estado, os sorogrupos mais prevalentes foram *Grippotyphosa* (27,6%), seguido pelos sorogrupos *Autumnalis* (19,14%) e *Pomona* (19,14%). Já na mesorregião Norte houve maior prevalência do sorovar *Icterohaemorrhagiae* (21,95%), seguido dos sorogrupos *Pomona* (17,07%) e *Sejroe* (17,07%).

4 DISCUSSÃO

Os achados deste trabalho mostraram uma alta prevalência da infecção nos rebanhos de equinos do estado de Santa Catarina, com diferença geográfica na distribuição dos sorovares representantes para os principais sorogrupos de *Leptospira* spp. Dentre os sorogrupos avaliados, os sorovares representantes do sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* se apresentaram como mais frequentes. Os membros deste sorogrupo representam o principal agente da leptospirose em muitas espécies, particularmente no Brasil (HAMOND et al., 2011). Entretanto, outros autores, ao avaliarem rebanhos com níveis elevados de abortamentos, morte embrionária e óbitos neonatais no Rio de Janeiro (Brasil), verificaram que os animais eram sororreativos ao sorovar *Bratislava* (PINNA et al., 2007; PINNA et al., 2010). Esta diferença regional quanto a circulação de sorovares também é mostrada neste trabalho, quando avaliada a soroprevalência nas cinco mesorregiões Catarinenses. Em um país com a extensão territorial como o Brasil, com uma fauna rica, permite grande variação quanto a sorovares predominantes nos diferentes estados e regiões, devido à diversidade de possíveis reservatórios, inclusive permitindo a descrição de novos sorovares (ALVES et al., 2016; VIEIRA et al., 2018).

Existem vários ciclos epidemiológicos na leptospirose que envolvem diferentes reservatórios e mecanismos de transmissão, sendo as condições ambientais sempre muito importantes para a ocorrência da doença (FAISAL et al., 2012). Cada sorovariedade tende a ser mantida por um hospedeiro específico e a prevalência do mesmo pode ser influenciada pela região envolvida (VIEIRA et al., 2018). Assim, o conhecimento dos sorovares prevalentes e seus hospedeiros de manutenção é essencial para o entendimento da dinâmica da infecção. Diferentes espécies de roedores podem ser reservatórios de sorovares distintos, mas os ratos (*Ratus* spp.) geralmente são hospedeiros de manutenção para sorovares dos sorogrupos *Icterohaemorrhagiae* e *Ballum* (HOUWERS et al., 2011; FAISAL et al., 2012). Contudo, outras espécies de animais participam da cadeia de transmissão da doença, como os bovinos que podem com frequência atuar como reservatórios dos sorovares *Hardjo*, *Pomona* e *Grippotyphosa* e os cães como reservatórios do sorovar *Canicola* (PETRAKOVSKY et al., 2014; TAGLIABUE et al., 2016). Essas espécies animais que podem servir de reservatórios estão amplamente distribuídas em todas as regiões do estado, podendo ser fonte de manutenção e transmissão da *Leptospira* spp.

Pesquisadores avaliaram a relação entre problemas reprodutivos e a infecção por *Leptospira* spp. (PINNA et al., 2014). Contudo, existem outras questões relacionadas a falhas

reprodutivas em equinos, por exemplo, idade das éguas, nutrição inadequada, outros processos infecciosos e não infecciosos que também devem ser considerados (DE MESTRE, 2013).

Trabalhos que relatam as diferenças entre a leptospirose determinada por sorovares incidentais ou adaptados, bem como a associação de cada sorovar com distúrbios reprodutivos específicos são escassos quando se refere aos equinos. A infecção por *Leptospira* spp. foi comprovada em casos de aborto, natimorto e morte neonatal em equinos nos EUA, sendo confirmada a infecção principalmente pelos sorovares *Pomona* e *Grippotyphosa* (DONAHUE et al., 1991). A associação entre problemas reprodutivos em equinos e a soropositividade para *Leptospira* spp. tem sido relatada em diversos trabalhos, embora geralmente em forma de surtos (PINNA et al., 2007; HAMOND et al., 2014).

No presente estudo não foram relatadas alterações clínicas compatíveis com quadros agudos de leptospirose, o que reforça a hipótese de que a infecção por *Leptospira* spp. em equinos na maioria das vezes ocorre de forma subclínica (PINNA et al., 2010; HAMOND et al., 2014).

5 CONCLUSÃO

A alta prevalência da infecção por *Leptospira* spp. e a dinâmica de distribuição de anticorpos para os representantes dos diferentes sorogrupos nas mesorregiões do estado de Santa Catarina evidenciou uma ampla distribuição da infecção e susceptibilidade dos animais. A maior prevalência nas mesorregiões do Vale do Itajaí e Grande Florianópolis e mesorregião Sul, pode ser influenciada por questões climáticas, sendo regiões litorâneas e de clima quente, propiciando a manutenção do agente no ambiente.

Além disso, sugere-se a necessidade de medidas mais eficientes voltadas ao controle da infecção, principalmente por se tratar de uma zoonose de grande importância para a saúde pública. Estes achados também revelaram a necessidade de estudos adicionais para identificar outros possíveis sorogrupos circulantes assim como, outras causas de abortamentos em equinos no estado de Santa Catarina.

6 REFERÊNCIAS

ALVES, J. R. A. et al. Epidemiological characterization of leptospirosis in horses in the state of Pernambuco, northeastern Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, p. 1-5, 2016.

DE MESTRE, A. Reproductive failure in horses identifying the problems. **Vet Record**, v.172, n.2, p. 42-43, 2013.

DONAHUE, J. M. et al. Diagnosis and prevalence of leptospira infection in aborted and stillborn horses. **J Vet Diagn Invest**, v. 3, n. 2, p. 148-51, Apr 1991.

ELLIS, W. A. Animal leptospirosis. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 387, p. 99-137, 2015.

EROL, E. et al. A diagnostic evaluation of real-time PCR, fluorescent antibody and microscopic agglutination tests in cases of equine leptospiral abortion. **Equine Vet J**, v. 47, n. 2, p. 171-4, Mar 2015.

FAISAL, S. M.; McDONOUGH, S. P.; CHANG, Y.-F. Leptospira: invasion, pathogenesis and persistence. In: ME, E. (Ed.). **The pathogenic spirochetes: strategies for evasion of host immunity and persistence**. New York, NY: Springer Science, 2012. p.143-172.

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, p. 473-476, 2014.

HAMOND, C. et al. Pulmonary hemorrhage in horses seropositive to leptospirosis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 413-415, 2011.

HAMOND, C. et al. The role of leptospirosis in reproductive disorders in horses. **Trop Anim Health Prod**, v. 46, n. 1, p. 1-10, Jan 2014.

HOUWERS, D. J. et al. Agglutinating antibodies against pathogenic Leptospira in healthy dogs and horses indicate common exposure and regular occurrence of subclinical infections. **Vet Microbiol**, v. 148, n. 2-4, p. 449-51, Mar 24 2011.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. 2017. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br>>

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical microbiology reviews**, v. 14, n. 2, p. 326, 2001.

OIE. Dourine. In: **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2015**. 2015. ed. [s.l.] OIE, 2015. p. 500.

PETRAKOVSKY, J. et al. Animal leptospirosis in Latin America and the Caribbean countries: reported outbreaks and literature review (2002-2014). **Int J Environ Res Public Health**, v. 11, n. 10, p. 10770-89, Oct 16 2014.

PINNA, A. et al. Potential differences between *Leptospira* serovars, host-adapted (Bratislava) and incidental (Copenhageni), in determining reproductive disorders in embryo transfer recipient mares in Brazil. **Veterinary Record**, v. 24, p. 1-4, 2014.

PINNA, M. et al. Seropositivity to *Leptospira interrogans* serovar Bratislava associated to reproductive problems without significant biochemical or hematological alterations in horses. **Ciência Rural**, v. 40, n. 10, p. 2214-2217, 2010. ISSN 0103-8478.

PINNA, M. H. et al. Outbreak of Equine Leptospirosis by S. Bratislava. **Online Journal of Veterinary Research**, v. 11, p. 1-4, 2007.

TAGLIABUE, S. et al. Serological surveillance of Leptospirosis in Italy: twoyear national data (20102011). **Vet Ital**, v. 52, n. 2, p. 129-38, Jun 30 2016.

THRUSFIELD, M. Statistics in epidemiology: methods, techniques, and applications. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 32, n. 1-2, p. 149-151, 1997.

VERMA, A.; STEVENSON, B.; ADLER, B. Leptospirosis in horses. **Vet Microbiol**, v. 167, n. 1-2, p. 61-6, Nov 29 2013.

VIEIRA, A. S.; PINTO, P. S.; LILENBAUM, W. A systematic review of leptospirosis on wild animals in Latin America. **Trop Anim Health Prod**, v. 50, n. 2, p. 229-238, Feb 2018.

CAPÍTULO II

ARTIGO II: FATORES DE RISCO RELACIONADOS A SOROPOSITIVIDADE PARA *Leptospira* spp. EM EQUINOS

Resumo

A leptospirose é uma doença infecciosa zoonótica, causada pela bactéria *Leptospira* spp. Em equinos, as consequências da infecção não são claras e os sorogrupo envolvidos variam dependendo da região. Sendo assim, este trabalho objetivou avaliar a soropositividade de equinos não vacinados na região Serrana Catarinense, identificar os sorogrupo circulantes e avaliar os possíveis fatores de risco associados à infecção. Para tal, foram estudados 207 equinos, aparentemente saudáveis, de 26 propriedades, sem histórico de vacinação contra leptospirose. As amostras de soro foram submetidas ao ensaio de aglutinação microscópica (MAT) para os principais sorogrupo de referência. Animais com título ≥ 100 foram considerados infectados. Os resultados da sorologia revelaram uma soropositividade em 45,4% (94/207) dos animais estudados. Com maior frequência foram observados anticorpos contra os sorogrupo *L. Australis* 16,9% (35/207), *L. Icterohaemorrhagiae* 10,6% (22/207) e *L. Grippotyphosa* 5,31% (11/207). Dentre os principais fatores de risco associados à infecção se destacaram o sistema de criação extensivo (OR=1,27; $p<0,05$) e a presença de outras espécies animais como bovinos (OR=3,85; $p<0,01$) e capivaras (OR=2,07; $p=0,06$). Os achados apresentados neste estudo mostraram que a leptospirose em equinos é endêmica na região da Serra Catarinense, e revelam a necessidade de medidas emergenciais de vigilância e controle específicas para esta importante zoonose nos plantéis de equinos catarinenses.

Palavras-chave: Diagnóstico. Sanidade animal. Doenças infecciosas.

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença infectocontagiosa zoonótica com grande importância para a saúde pública mundial, causada por espécies patogênicas do gênero *Leptospira* spp. (DE BRITO et al., 2018). Em equinos a infecção está associada à uveíte recorrente (VERMA e STEVENSON, 2012), abortos, natimortos ou potros neonatos fracos (BROUX et al., 2012; HAMOND et al., 2014; PINNA et al., 2014). Os equinos são hospedeiros incidentais para a maioria dos sorovares como: *Icterohaemorrhagiae*, *Canicola*, *Pomona* e *Grippotyphosa* (LOUREIRO et al., 2013; ELLIS, 2015), sendo considerado como reservatório apenas do sorovar *Bratislava* (ARTIUSHIN et al., 2012).

De modo geral, a infecção nos equinos ocorre de forma direta pelo contato com urina contaminada ou fluidos placentários de animais infectados, ou indiretamente a partir do

ambiente contaminado (FAISAL et al., 2012). Mesmo com uma intensa resposta imune humoral, o agente pode sobreviver e se multiplicar, sendo eliminado na urina pelos equinos por até três meses (YAN et al., 2010). Neste contexto, pode representar uma zoonose negligenciada, visto que os equinos na maioria das regiões representam um animal de estimação e, portanto, com relação muito próxima aos humanos de diferentes faixas etárias. Em 2018, 237 casos de leptospirose foram confirmados no estado de Santa Catarina. Desses, 5 acabaram indo a óbito. A maioria dos casos foi registrada em homens e maior parte das contaminações aconteceu na área urbana (DIVE, 2019).

A soroprevalência para leptospirose em equinos varia consideravelmente, dependendo da localização geográfica, fatores de risco e sorovares estudados (CASELANI, 2012; LASTA et al., 2013; FINGER et al., 2014). A prevalência e os sorovares envolvidos dependente dos reservatórios presentes (PETRAKOVSKY et al., 2014), visto que estes podem sofrer variações regionais, o que certamente contribui para diferenças entre dados de prevalência entre países ou regiões (LOUREIRO et al., 2013).

Em todas as regiões endêmicas, a principal estratégia de controle da leptospirose é o diagnóstico seguido da vacinação dos animais. Entretanto, a imunidade sorovar específica, a diversidade de sorovares e a ausência de dados soroepidemiológicos para áreas endêmicas representam um desafio para a definição dos antígenos vacinais a serem utilizados (MARTINS et al., 2017). Neste contexto, o conhecimento dos sorovares prevalentes é essencial para entender a epidemiologia da doença, possibilitar a descoberta de novos portadores, possíveis reservatórios e auxiliar na definição dos antígenos vacinais a serem utilizados nas estratégias de imunoprofilaxia (ALVES et al., 2016; VIEIRA et al., 2018). Em Santa Catarina, até o momento não foram realizados estudos de prevalência para leptospirose em equinos, impedindo a atualização das cepas vacinais a serem utilizadas nos programas de controle da infecção. Portanto, este estudo teve como objetivo verificar a ocorrência de anticorpos contra a *L. interrogans* em amostras de soro de equinos, não vacinados, na região da Serra Catarinense, bem como, investigar os possíveis fatores de risco associados à infecção.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais e amostras

O número total de equinos no Estado de Santa Catarina é de aproximadamente 112.766 animais, sendo 32.451 (28,77%) localizados na região da Serra Catarinense (IBGE, 2017). Para este estudo, foram avaliadas 207 amostras de sangue de equinos não vacinados, sem

sintomatologia ou histórico de doença recente, de 26 rebanhos da região Serrana Catarinense. Os animais foram contidos manualmente e as amostras de sangue colhidas por meio de venopunção da veia jugular em tubos a vácuo sem anticoagulante, mantidas sob refrigeração a 10°C. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas, divididas em alíquotas de soro e congeladas a -20°C até a análise.

2.2 Teste sorológico

As amostras foram examinadas para a presença de anticorpos anti-*Leptospira* spp. por meio do teste de aglutinação microscópica (MAT) usando antígenos vivos cultivados em meio líquido (EMJH) conforme recomendação da Organização Internacional de Epizootias (OIE, 2015). Um painel de antígenos com 14 sorogrupo (18 sorovares de referência), gentilmente cedido pelo Laboratório de Microbiologia Veterinária da Universidade Federal Fluminense (UFF/RJ), foi usado como antígeno: *L. Australis* (*Bratislava, Australis*), *L. Autumnalis* (*Autumnalis*), *L. Cynopteri* (*Cynopteri*), *L. Bataviae* (*Bataviae*), *L. Canicola* (*Canicola*), *L. Grippotyphosa* (*Grippotyphosa*), *L. Panama* (*Panama*), *L. Icterohaemorrhagiae* (*Copenhageni, Icterohaemorrhagiae*), *L. Louisiana* (*Louisiana*), *L. Pomona* (*Pomona*), *L. Sejroe* (*Guaricura, Hardjobovis; Wolffi*), *L. Pyrogenes* (*Pyrogenes*), *L. Tarassovi* (*Tarassovi*) e *L. Ballum* (*Castellonis*).

Resumidamente, as suspensões antigênicas de leptospires vivas dos respectivos sorovares foram adicionadas a soro diluído em série em placas de microtitulação e incubadas. A aglutinação foi examinada usando microscopia de campo escuro (100 \times). Os títulos foram estimados como a maior diluição sérica que aglutinou pelo menos 50% das leptospires. Animais com título ≥ 100 foram considerados infectados. Os ensaios de MAT foram realizados no Laboratório de Doenças Infecciosas dos Animais da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Curitibanos/SC.

2.3 Dados epidemiológicos

Os proprietários dos equinos foram entrevistados para coletar informações sobre o rebanho e identificar os possíveis fatores de risco associados à infecção por *Leptospira* spp. O questionário aplicado abordou informações como: raça do animal, sexo (macho/fêmea), local da criação (urbano/rural), sistema de criação (extensivo/semi intensivo/intensivo), presença de roedores (sim/não), contato com animais silvestres (sim/não), contato com capivaras (sim/não), contato com javalis (sim/não), contato com bovinos (sim/não), contato com ovinos (sim/não), contato com suínos (sim/não), contato com cães (sim/não), histórico de problemas reprodutivos,

uveíte ou doença clínica diagnosticada ou com suspeita de leptospirose (sim/não), vacinação contra leptospirose (sim/não).

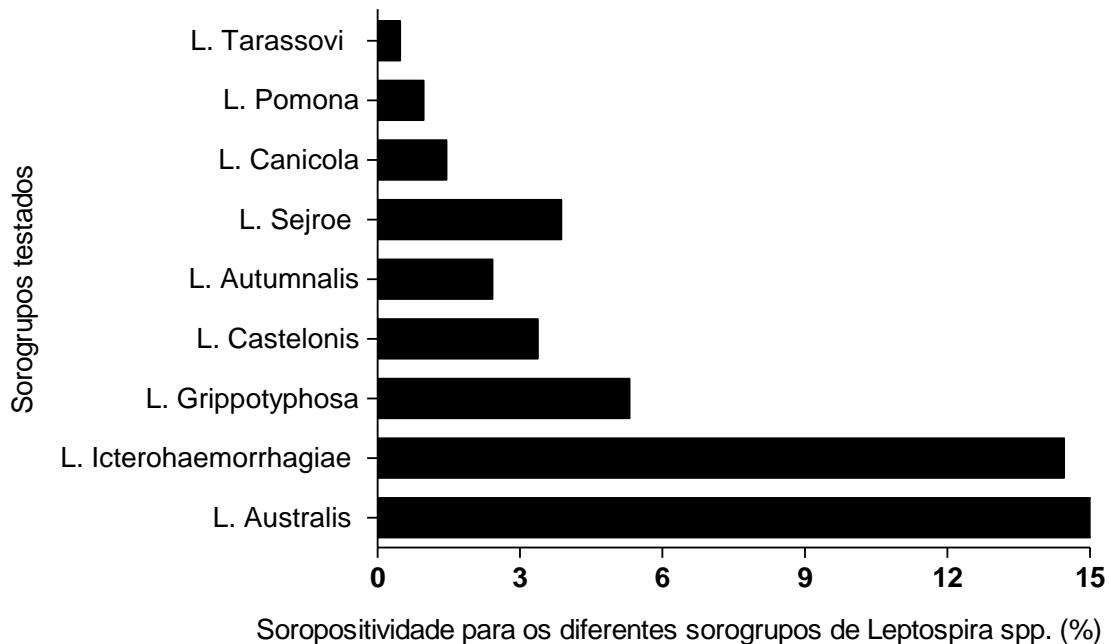
2.4 Análise estatística

Os dados gerados pelas entrevistas (variáveis independentes) e pelo teste MAT (variável resposta) foram registrados e analisados utilizando o pacote estatístico SAS (versão 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC). A estatística descritiva foi realizada em todas as variáveis independentes, rastreadas com base na variável resposta (MAT positivo ou negativo). Para estimar o risco de infecção associado às variáveis independentes (variáveis qualitativas) foi utilizado o modelo de regressão logística (HOSMER e LEMESHOW, 1989). Os valores de p foram apresentados, sendo considerado estatisticamente significante quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

Os dados deste estudo mostraram que dos 26 plantéis estudados, 80% (21/26) foram positivos (com pelo menos um animal soropositivo) para infecção por *Leptospira* spp. Do total de equinos avaliados 45,4% (94/207) foram soropositivos para *Leptospira* spp. Os sorogrupos mais frequentemente diagnosticados no teste de MAT foram *Australis (Bratislava)* 16,9% (35/207); *Icterohaemorrhagiae (Icterohaemorrhagiae e Copenhageni)* 14,4% (30/207), *Grippotyphosa (Grippotyphosa)* 5,31% (11/207), *Sejroe (Hardjobovis e Guaricura)* 3,8% (8/207), *Ballum (Castellonis)* 3,4% (7/207), *Autumnalis (Autumnalis)* 2,4% (5/207) *Canicola (Canicola)* 1,4% (3/207), *Pomona (Pomona)* 0,9% (2/207) e *Tarassovi (Tarassovi)* 0,5% (1/207) com titulações variando de 1: 100 (232 - 100%), 1: 200 (45 - 19,40%) a 1: 400 (4 - 1,72%) (Figura 1).

Figura 1 – Soropositividade das amostras de soro equino (n=207) para os diferentes sorogrupos de *Leptospira* spp. na região Serrana do estado de Santa Catarina, Brasil.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019

A distribuição de animais soropositivos de acordo com as variáveis independentes (variáveis qualitativas) analisadas está apresentada na Tabela 1. A análise de regressão mostrou associação entre a soropositividade para *Leptospira* spp. e variáveis qualitativas como sistema de criação extensivo (OR=1,27, $p<0,05$), histórico de abortamentos ou outras formas clínicas (OR=2,56, $p<0,01$), presença de bovinos (OR=3,85, $p<0,01$) e capivaras (OR= 2,56, $p=0,06$) (Tabela 2). Para sorovares específicos, houve associação entre a presença de capivaras (OR=14,0, $p<0,001$) e suínos (OR=21,76, $p<0,001$) e a soropositividade para *L. Australis* (*Bratislava*), e histórico de abortamento ou outras formas clínicas (OR=31,11, $p<0,001$) e a presença de ovinos (OR=9,28, $p<0,001$) e a infecção por *L. Icterohaemorrhagiae* (*Copenhageni* e *Icterohaemorrhagiae*), respectivamente (Tabela 2).

Tabela 1 - Análise descritiva das variáveis independentes (variáveis qualitativas) com base na variável resposta (MAT positivo ou negativo) para os animais (n=207) e propriedades (n=26) avaliados e segundo sorologia positiva para *Leptospira* spp (n=94).

	Variáveis qualitativas	Frequência		Sorologia positiva <i>Leptospira</i> spp.	
		n	%	n	%
Sexo	Macho	100	48,31	40	42,55
	Fêmea	107	51,69	54	57,45
Idade	1 a 3 anos	56	27,05	19	20,21
	4 a 9 anos	100	48,31	49	52,13
	> 9 anos	51	24,64	26	27,66
Raça	Crioula	124	59,91	60	63,83
	Puro Sangue Inglês	51	24,64	20	21,28
	Quarto de Milha	21	10,14	10	10,64
	Outras	11	5,31	04	4,25
Local	Urbano	84	40,58	30	31,91
	Rural	123	59,42	64	68,09
Sistema de criação	Intensivo	85	41,06	39	41,49
	Semi-intensivo	66	31,88	19	20,21
	Extensivo	56	27,05	36	38,3
Histórico de doença	Sim	90	43,48	44	46,8
	Não	117	56,52	50	53,2
Contato com roedores	Sim	207	100	94	100
	Não	0	0	0	0
Contato com capivaras	Sim	128	61,84	65	69,15
	Não	79	38,16	29	30,85
Contato com javalis	Sim	19	9,18	11	11,7
	Não	188	90,82	83	88,3
Contato com outros animais silvestres	Sim	163	78,74	76	80,85
	Não	44	21,26	18	19,15
Contato com bovinos	Sim	132	63,77	73	77,66
	Não	75	36,23	21	22,34
Contato com suínos	Sim	30	14,49	20	21,27
	Não	177	85,51	74	78,72
Contato com ovinos	Sim	61	29,47	36	38,3
	Não	146	70,53	58	61,7
Contato com cães	Sim	207	100	94	100
	Não	0	0	0	0

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Tabela 2. Fatores de risco para infecção por *Leptospira* spp. em equinos, mostrando valores de odds ratio (OR) e intervalo de confiança (IC) para equinos com sorologia positiva para *Leptospira* spp. (MAT positivo ou negativo) e infecção pelo sorogrupo *L. Australis* (Bratislava) ou *L. Icterohaemorrhagiae* (Copenhageni e *Icterohaemorrhagiae*).

Padrão sorológico	Variável qualitativa	OR	IC 95% - Risco		Valores de p
			Mínimo	Máximo	
<i>Leptospira</i> spp. (MAT positivo ou negativo)	Sistemas de criação extensivo	1,27	0,52	3,13	p<0,05
	Contato com bovinos	3,85	1,69	8,77	p<0,01
	Histórico de doença	2,56	1,27	5,16	p<0,01
	Contato com capivara	2,07	0,96	4,45	p=0,06
<i>L. Australis</i> (Bratislava)	Contato com capivara	14,00	3,39	57,86	p<0,001
	Contato com suínos	21,76	7,29	64,94	p<0,001
<i>L. Icterohaemorrhagiae</i> (Copenhageni e <i>Icterohaemorrhagiae</i>)	Histórico de doença	31,11	6,37	151,90	p<0,001
	Contato com ovinos	9,28	3,13	27,48	p<0,001

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

4 DISCUSSÃO

Os dados deste estudo mostraram que 80% (21/26) dos plantéis avaliados foram positivos, com pelos um animal soropositivo para infecção por *Leptospira* spp. Considerando que as amostras foram obtidas de propriedades urbanas e rurais, e, cada vez mais, as atividades equestres de lazer envolvem humanos de diferentes faixas etárias (MENY et al., 2019), estes dados mostram uma zoonose ainda negligenciada, devido à ausência de programas específicos de controle.

Outros estudos realizados no Brasil mostraram diferenças substanciais na incidência e prevalência de sorovares de acordo com a região geográfica (FINGER et al., 2014; OLIVEIRA FILHO et al., 2014; ALVES et al., 2016). Conforme Finger et al. (2014), o sorogrupo mais prevalente na região de Curitiba (sul do Brasil) foi *Icterohaemorrhagiae*, já Oliveira Filho et al. (2014) observaram maior prevalência do sorogrupo *Panama* na região de Paraíba (Nordeste do Brasil), quando avaliaram equinos utilizados no trabalho. No presente estudo foi observada 45,4% (94/207) de soropositividade dos equinos testados para *Leptospira* spp, sendo os sorogrupos mais frequentemente diagnosticados na MAT *Australis* (Bratislava) - 16,9% (35/207); *Icterohaemorrhagiae* (*Icterohaemorrhagiae* e *Copenhageni*) - 14,4% (30/207) e *Grippotyphosa* (*Grippotyphosa*) - 5,31% (11/207). A diversidade de sorovares circulantes impacta diretamente nos programas de vacinação, visto que a maioria das vacinas comerciais não contemplam todos os sorogrupos aos quais os animais estão expostos.

Também se observa que equinos criados de forma extensiva (OR= 1,27; p<0,05) e em contato com bovinos (OR= 3,85; p<0,01) têm maior chance de apresentar leptospirose. Segundo Ellis (2015), os bovinos são considerados os principais hospedeiros dos sorovares *Hardjo*, *Pomona* e *Grippotyphosa*, representando um reservatório e potencial fator de risco para infecção de outras espécies animais como ovinos e equinos que frequentemente coabitam os mesmos ambientes (COUSINS et al., 1989; SILVA et al., 2007).

Apesar da leptospirose ser considerada subclínica nos equinos (HAMOND et al., 2012), os dados deste estudo mostraram que há maior risco da infecção (OR=2,56; p<0,01) em propriedades com histórico de sinais clínicos da doença como abortamento, nascimentos de potros fracos e repetição de cio, principalmente quando considerado o sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* (OR= 9,28; p<0,001). Pinna et al. (2014) em estudo realizado em equinos com histórico de problemas reprodutivos, também observaram um maior risco da infecção para animais soropositivos aos sorogrupos *Icterohaemorrhagiae* (*Copenhageni*) e *Australis* (*Bratislava*).

Segundo Petrakovskiy et al. (2014), uma variedade maior de sorogrupos circulantes em uma região está associada a uma fauna mais variada em detrimento a uma região com poucos hospedeiros animais. No presente estudo, foi possível observar uma grande variedade de sorogrupos detectados na MAT como *Australis* (*Bratislava*), *Icterohaemorrhagiae* (*Icterohaemorrhagiae* e *Copenhageni*), *Grippotyphosa* (*Grippotyphosa*), *Sejroe* (*Hardjobovis* e *Guaricura*), *Ballum* (*Castellonis*), *Autumnalis* (*Autumnalis*), *Canicola* (*Canicola*), *Pomona* (*Pomona*) e *Tarassovi* (*Tarassovi*), sugerindo que existem várias espécies de reservatórios potenciais para *Leptospira* spp. na região.

Apesar de muitos animais silvestres atuarem como reservatórios de leptospiras, o real papel destes como fonte de infecção para animais e humanos ainda não está clara (VIEIRA et al., 2018). Segundo Petrakovskiy et al. (2014), o contato maior com o ambiente e outras espécies pode ser considerado um fator de risco para a infecção em equinos. Os resultados do presente trabalho mostraram maior risco da doença em animais em contato com capivaras (OR= 2,07; p=0,06) e bovinos (OR= 3.85; p<0,01) (Tabela 2). As capivaras (*Hidrochoerus hydrochoeris*) na região serrana Catarinense apresentam intensa proliferação atualmente devido à baixa predação, são encontradas até mesmo no meio urbano. No Brasil, as capivaras também têm sido estudadas como reservatórios de leptospiras já sendo identificadas como sororreagentes a diferentes sorovares como *Icterohaemorrhagiae*, *Copenhageni*, *Pomona*, *Castellonis*, *Grippotyphosa*, *Hardjo*, *Canicola* e *Bratislava* (LANGONI et al., 2016).

Os resultados do presente estudo mostraram que o contato com suínos (OR= 21,76; p<0,001) e ovinos (OR=9,28; p<0,001) aumentam a chance de equinos apresentarem infecção por representantes do sorogrupo *Australis* e *Icterohaemorrhagiae*, respectivamente. Conforme Pinto et al. (2016), o sorovar *Bratislava* (sorogrupo *Australis*) é considerado adaptado e mantido pelos equinos e suínos, podendo determinar alterações reprodutivas, ou se apresentar de forma subclínica. Os ovinos por sua vez podem atuar como hospedeiros de manutenção ou como hospedeiros acidentais dependendo da região e condições de criação, representando uma fonte de infecção para bovinos e equinos, principalmente pelos sorovares *Hardjo*, *Autumnalis*, *Icterohaemorrhagiae* e *Pomona* (MELO et al., 2010).

A presença de roedores (ratos, camundongos) e cães também foi avaliada, entretanto, por estarem presentes em todas as propriedades não foram incluídos na análise deste estudo. Entretanto, os roedores devem ser considerados na cadeia de transmissão, pois representam um dos principais reservatórios para *Leptospira* spp. na natureza, principalmente para os sorogrupos *Icterohaemorrhagiae* e *Ballum* (HOUWERS et al., 2011). Segundo dados de Pinto e colaboradores (2016), os sorovares mais frequentes em cães são *Canicola* e *Icterohaemorrhagiae* podendo representar possível reservatório do agente para equinos e humanos tanto no meio urbano quanto rural.

5 CONCLUSÃO

Os achados apresentados neste estudo mostram uma alta frequência da infecção por *Leptospira* spp. em equinos na região da serra catarinense, revelando a necessidade de medidas emergenciais de vigilância para o controle desta importante zoonose nos plantéis de equinos. Além disso, chama a atenção para a necessidade de novos estudos destinados a orientar a atualização das cepas vacinais utilizadas comercialmente, uma vez que essas na sua maioria não contemplam todos os sorovares circulantes.

Os principais fatores de risco associados a soropositividade nas propriedades estudadas foram relacionados ao contato com outras espécies animais, regime de criação extensivo e histórico de suspeita da doença na propriedade. Nesse sentido, a forma de contagio da doença se torna facilitada, pois dificilmente se consegue manter os equinos longe do contato com outras espécies animais, quando se utiliza o sistema extensivo de criação.

6 REFERÊNCIAS

- ALVES, J. R. A. et al. Epidemiological characterization of leptospirosis in horses in the state of Pernambuco, northeastern Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, p. 1-5, 2016.
- ARTIUSHIN, S. C. et al. Real-time PCR for detection of *Leptospira interrogans* serovar Pomona type kennewicki in equine clinical specimens. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, p. 53, 2012.
- BROUX, B. et al. Acute respiratory failure caused by *Leptospira* spp. in 5 foals. **J Vet Intern Med**, v. 26, n. 3, p. 684-7, May-Jun 2012.
- CASELANI, K. E. A. Estudo soroepidemiológico de leptospirose em equinos utilizados para tração urbana. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 3, p. 582-587, 2012.
- COUSINS, D. V. et al. Evidence for sheep as a maintenance host for *Leptospira interrogans* serovar hardjo. **Vet Rec**, v. 124, n. 5, p. 123-4, Feb 4 1989.
- DE BRITO, T.; SILVA, A. M. G.; ABREU, P. A. E. Pathology and pathogenesis of human leptospirosis: a commented review. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 60, n. 23, p. 1-10, 2018.
- DIVE, Diretoria de Vigilância Epidemiológica. 2019. Disponível em: <<http://www.dive.sc.gov.br>>
- ELLIS, W. A. Animal leptospirosis. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 387, p. 99-137, 2015.
- FAISAL, S. M.; McDONOUGH, S. P.; CHANG, Y.-F. *Leptospira*: invasion, pathogenesis and persistence. In: ME, E. (Ed.). **The pathogenic spirochetes: strategies for evasion of host immunity and persistence**. New York, NY: Springer Science, 2012. p.143-172.
- 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, p. 473-476, 2014.
- HAMOND, C.; MARTINS, G.; LILENBAUM, W. Subclinical leptospirosis may impair athletic performance in racing horses. **Trop Anim Health Prod**, v. 44, n. 8, p. 1927-30, Dec 2012.
- HAMOND, C. et al. The role of leptospirosis in reproductive disorders in horses. **Trop Anim Health Prod**, v. 46, n. 1, p. 1-10, Jan 2014.

HOSMER, D. W.; LEMESHOW, S. **Applied Logistic Regression**. New York: John Wiley & Sons, 1989.

HOUWERS, D. J. et al. Agglutinating antibodies against pathogenic *Leptospira* in healthy dogs and horses indicate common exposure and regular occurrence of subclinical infections. **Vet Microbiol**, v. 148, n. 2-4, p. 449-51, Mar 24 2011.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. 2017. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br>>

LANGONI, H. et al. Anti-leptospirosis agglutinins in Brazilian capybaras (*hydrochoerus hydrochaeris*). **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**, v. 22, p. 4, 2016.

LASTA, C. S. 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.

LOUREIRO, A. P.; HAMOND, C.; LILENBAUM, W. Leptospirosis in horses. **Vet Rec**, v. 172, n. 18, p. 479-80, May 4 2013.

MARTINS, M. et al. Humoral response in naturally exposed horses after leptospiral vaccination. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 57, p. 5, 2017.

MELO, L. S. S. et al. Principais aspectos da infecção por *Leptospira* sp em ovinos. **Ciência Rural**, v. 40, n. 5, p. 1235-1241, 2010.

MENY, P. et al. Seroprevalence of leptospirosis in human groups at risk due to environmental, labor or social conditions. **Rev Argent Microbiol**, Apr 9 2019.

OIE. Dourine. In: **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2015**. 2015. ed. [s.l.] OIE, 2015. p. 500.

OLIVEIRA FILHO, R. B. et al. Spatial characterization of *Leptospira* spp. infection in equids from the Brejo Paraibano micro-region in Brazil. **Geospat Health**, v. 8, n. 2, p. 463-9, May 2014.

PETRAKOVSKY, J. et al. Animal leptospirosis in Latin America and the Caribbean countries: reported outbreaks and literature review (2002-2014). **Int J Environ Res Public Health**, v. 11, n. 10, p. 10770-89, Oct 16 2014.

PINNA, A. et al. Potential differences between *Leptospira* serovars, host-adapted (Bratislava) and incidental (Copenhageni), in determining reproductive disorders in embryo transfer recipient mares in Brazil. **Veterinary Record**, v. 24, p. 1-4, 2014.

PINTO, P. S.; LIBONATI, H.; LILENBAUM, W. A systematic review of leptospirosis on dogs, pigs, and horses in Latin America. **Trop Anim Health Prod**, v. 49, n. 2, p. 231-238, 2016.

SILVA, E. F. et al. Isolation of *Leptospira noguchii* from sheep. **Vet Microbiol**, v. 121, n. 1-2, p. 144-9, Mar 31 2007.

VERMA, A.; STEVENSON, B. Leptospiral uveitis - there is more to it than meets the eye! **Zoonoses Public Health**, v. 59 Suppl 2, p. 132-41, Sep 2012.

VIEIRA, A. S.; PINTO, P. S.; LILENBAUM, W. A systematic review of leptospirosis on wild animals in Latin America. **Trop Anim Health Prod**, v. 50, n. 2, p. 229-238, Feb 2018.

YAN, W. et al. Experimental *Leptospira interrogans* serovar Kennewicki infection of horses. **J Vet Intern Med**, v. 24, n. 4, p. 912-7, Jul-Aug 2010.

CAPÍTULO III

ARTIGO III: EXAMES LABORATORIAIS EM EQUINOS SOROPOSITIVOS PARA *Leptospira* spp. E SEM SINAIS DE DOENÇA CLÍNICA

Resumo

A leptospirose em equinos se apresenta principalmente sob a forma subclínica. As formas subclínicas de várias infecções podem afetar um ou mais sistemas e, dessa forma, prejudicar o desempenho dos animais. A detecção laboratorial de tais alterações deve ser levada em consideração, sendo útil para melhor compreensão dos efeitos sistêmicos da infecção por *Leptospira* spp. O presente estudo pretendeu avaliar o hemograma completo, metabolismo oxidativo eritrocitário por meio da determinação de marcadores eritrocitários (glutatona reduzida e malondialdeído), fragilidade osmótica eritrocitária e bioquímica clínica, em equinos sem sintomatologia clínica ou com histórico de doença recente, com sorologia negativa e positiva para leptospirose. Foram utilizados 207 equinos, de 26 propriedades. Todos os animais eram adultos, machos ou fêmeas, não vacinados contra leptospirose, sem presença de sinais clínicos evidentes ou com histórico de doença clínica recente. As amostras de soro foram submetidas ao ensaio de Soroaglutinação Microscópica (MAT), contra 18 sorovares. A soroprevalência para *Leptospira* spp. foi de 45,4% (94/207). Os sorovares de maior incidência foram *L. Bratislava* 16,9% (35/207), *L. Icterohaemorrhagiae* 10,6% (22/207) e *L. Grippotyphosa* 5,31% (11/207). Foram observadas poucas diferenças hematológicas e bioquímicas entre equinos soropositivos e soronegativos ($p < 0,05$), que não apresentaram relevância clínica, já que os valores se mantiveram dentro do intervalo de referência para a espécie. Os achados dos marcadores de metabolismo oxidativo sugeriram uma discreta produção de espécies reativas de oxigênio e de peroxidação lipídica. Portanto, equinos soropositivos para *Leptospira* spp. não apresentaram alteração consistente em valores hematológicos, bioquímicos séricos ou do metabolismo oxidativo.

Palavras-chave: Leptospirose subclínica. Metabolismo oxidativo. Fragilidade osmótica.

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença zoonótica, com distribuição mundial, causada por espiroquetas pertencentes ao gênero *Leptospira* (ELLIS, 2015). Nos equinos a infecção por *Leptospira* spp. geralmente é assintomática, mas pode causar grande impacto para o agronegócio devido às perdas reprodutivas como abortos e natimortos e o risco para a saúde pública (ARTIUSHIN et al., 2012). Alguns pesquisadores relataram que, mesmo em infecções subclínicas, o desempenho esportivo de equinos pode ser prejudicado (HAMOND et al., 2012).

As leptospires patogênicas quando infectam os equinos apresentam tropismo pelo tecido renal, olhos e trato reprodutivo da fêmea (FAISAL et al., 2012). Uma vez a infecção instalada,

pode haver a evolução para doença aguda em hospedeiros sensíveis, bem como o desenvolvimento de imunidade protetora e eliminação do microrganismo, ou desenvolvimento do estado de portador crônico. A intensidade das lesões teciduais está intimamente relacionada à estirpe do sorovar e a adaptabilidade do hospedeiro (DE BRITO et al., 2018).

A patogênese da *Lepstospira* ainda não é bem compreendida (ADLER, 2014), mas doenças infecciosas importantes em animais de produção, geralmente, estão associadas ao chamado estresse oxidativo. Este é um fenômeno químico que envolve um desequilíbrio nos mecanismos fisiológicos do animal. Muitos pesquisadores consideram os mecanismos relacionados ao estresse oxidativo como importantes eventos no desenvolvimento da doença (LYKKESFELDT e SVENDSEN, 2007).

As células funcionam como unidades estruturais e funcionais, sendo sensíveis à ação de diversos fatores danosos que podem interferir no seu metabolismo. Dentre essas possíveis agressões à célula, estão presentes as espécies reativas do oxigênio (ERO). Todas as organelas celulares podem sofrer alterações quando interagem com as ERO, entretanto, a membrana celular é a estrutura que, se atingida, desencadeia um dano à célula mais significativo, pois resulta na peroxidação lipídica (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

O teste do malondialdeído (MDA) é uma das técnicas mais utilizadas para avaliar a oxidação de lipídeos. O MDA é um dialdeído formado como produto secundário durante a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados, principalmente o ácido araquidônico. Há ainda, um sistema de defesa enzimático para proteger o organismo dos efeitos danosos dos radicais livres (BENZIE, 1996), uma dessas enzimas é a glutationa reduzida (GSH). A GSH está presente na maioria das células, sendo considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Outra avaliação interessante é a fragilidade osmótica eritrocitária (FOE), que verifica a resistência osmótica dos eritrócitos em concentrações decrescentes de solução salina. A resistência depende da forma, volume, tamanho, conteúdo de hemoglobina e meia vida dos eritrócitos, e pode ser alterada por vários fatores fisiológicos ou patológicos (ELIAS et al., 2004). A utilização deste teste permite observar variações dos resultados em enfermidades como em alguns casos de anemia, alterações metabólicas ou carenciais e na avaliação da ação de alguns fármacos sobre o sistema hematopoiético (SANT'ANA et al., 2001).

O objetivo do presente estudo foi avaliar os valores hematológicos, do metabolismo oxidativo eritrocitário e bioquímicos, relacionando com os achados laboratoriais de equinos soropositivos para *Lepstospira* spp. e sem sintomatologia clínica, para identificar possíveis prejuízos que a bactéria possa estar causando no organismo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais e amostras

Foram utilizados 207 equinos, escolhidos aleatoriamente, em 26 propriedades, localizadas na região serrana Catarinense. Os equinos estudados eram todos saudáveis, sem presença de sinais clínicos evidentes ou com histórico de doença clínica recente. Todos os animais eram adultos com idade média de $6,7 \pm 2,5$ anos, sendo 100 machos e 107 fêmeas, não vacinados contra leptospirose. As amostras de sangue foram colhidas por venopunção da veia jugular em tubos a vácuo sem anticoagulante e com anticoagulantes EDTA e heparina. As amostras foram colhidas e em seguida processadas. As amostras de soro foram separadas em alíquotas e armazenadas a -20°C para posterior análise.

2.2 Teste sorológico

As amostras de soro foram submetidas ao ensaio de Soroaglutinação Microscópica (MAT), conforme recomendação da Organização Internacional de Epizootias (OIE, 2015). Animais com títulos ≥ 100 , foram considerados positivos para leptospirose. Cada amostra de soro foi testada para 18 sorovares. Os testes foram realizados no Laboratório de Controle de Doenças dos Animais da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Campus de Curitibanos/SC.

2.3 Hemograma

Para a realização do hemograma foram confeccionadas as extensões sanguíneas, coradas com corante hematológico rápido. A determinação do volume globular foi realizada pela técnica do microhematócrito (JAIN, 1993). A contagem total de eritrócitos e leucócitos e a dosagem de hemoglobina foram realizadas em contador automático (SDH-3 Vet, Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, Brasil). O volume globular médio (VGM) e a concentração de hemoglobina globular média (CHGM) foram obtidos por cálculos. A contagem diferencial de leucócitos e estimativa de plaquetas foi realizada nas extensões sanguíneas em microscopia óptica de luz (1000 x).

2.4 Proteína plasmática total e fibrinogênio

A determinação da concentração da proteína plasmática total (PPT) foi realizada por refratometria (Digit, Biosystems, Curitiba, Brasil) e o fibrinogênio pela técnica de precipitação pelo calor (SCHALM, et al., 1970).

2.5 Fragilidade osmótica

A fragilidade osmótica foi determinada em concentrações crescentes de cloreto de sódio (NaCl), pH 7,4, determinando-se a porcentagem de hemólise em cada concentração (PARPART et al., 1947). O resultado deste teste expressa a concentração de NaCl correspondente a 50% de hemólise (H50), calculado a partir da curva dos percentuais de hemólise nas concentrações, ajustado por um modelo linear generalizado para as proporções com função de ligação Probit (MCCULLOCH e SEARLE, 2001).

2.6 Metabolismo oxidativo

Para a avaliação do metabolismo oxidativo foram utilizados dois ensaios. A concentração de malondialdeído (MDA) eritrocitário foi avaliado indiretamente pela mensuração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA), na sua concentração basal (MDA-Erit-basal) e após estímulo oxidativo (MDA-Erit estimulado) (MACHADO et al., 2007). Para mensuração da glutationa (GSH) foi realizada técnica segundo o método de Beutler (BEUTLER, 1984).

2.7 Bioquímica clínica

As dosagens bioquímicas foram realizadas com a utilização de kits comerciais específicos para cada análise (Labtest, Diagnóstica, Lagoa Santa, Brasil) em analisador automático (Labmax Plenno, Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, Brasil). Os testes bioquímicos realizados foram: ureia (Enzimático UV), creatinina (1010. Colorimétrico - Picrato alcalino - Jaffé), aspartato aminotransferase (AST) (Cinético - UV-IFCC), fosfatase alcalina (FA) (Colorimétrico - Browers e Mc Comb modificado), proteína sérica total (PST) (Colorimétrico - Biureto), albumina (Colorimétrico - Verde de Bromocresol), globulinas (subtração do valor de albumina ao da PST), glicose (COD-Trinder), gama glutamiltransferase (GGT) (Szasz modificado), bilirrubina total (Colorimétrico - Labtest DCA), bilirrubina direta (Colorimétrico - Labtest DCA), bilirrubina indireta (subtração do valor de bilirrubina indireta ao da bilirrubina total).

2.8 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote estatístico SAS (versão 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC). Os dados obtidos foram submetidos ao método de análise de variância (ANOVA) e posteriormente ao teste de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

Foi verificado que 45,4% (94/207) dos equinos apresentaram sorologia positiva para leptospirose. Os sorovares de maior incidência foram *L. Bratislava* 16,9% (35/207), *L. Icterohaemorrhagiae* 10,6% (22/207) e *L. Grippotyphosa* 5,31% (11/207). Houve sororreatividade também para os sorovares *Autumnalis*, *Castellonis*, *Pomona*, *Hardjobovis*, *Guaricura*, *Tarassovi*, *Canicola* e *Copenhageni*. Dos animais positivos 7,44% foram reativos para mais de um sorovar.

Para os valores hematológicos houve diferença estatística somente no VGM entre soropositivos e negativos ($p<0,01$) e nos valores de hemoglobina na comparação por sorovar, onde a *L. Grippotyphosa* diferiu dos demais ($p<0,05$). Os valores hematológicos não apresentaram alterações de acordo com os valores de referência utilizados ou em comparação com os animais soronegativos, inclusive quando avaliados os sorovares mais frequentes separadamente (Tabela 1).

Tabela 1 - Valores médios \pm desvio padrão do eritrograma conforme sorologia positiva e negativa para *Leptospira* spp. e separadamente pelos sorovares de maior prevalência.

Eritrograma	Negativos (n=113)	Positivos (n=94)	<i>Bratislava</i> (n=35)	<i>Icterohaemorrhagiae</i> (n=22)	<i>Grippotyphosa</i> (n=11)	Valores de referência *
Eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	$8,68 \pm 1,2$	$8,59 \pm 1,1$	$8,65 \pm 1,1$	$8,51 \pm 0,9$	$8,5 \pm 0,9$	6,5 – 12,5
Hemoglobina (g/dL)	$11,68 \pm 1,6^{\text{B}}$	$11,87 \pm 1,6$	$11,79 \pm 1,5^{\text{B}}$	$11,31 \pm 1,57^{\text{B}}$	$13,16 \pm 2,1^{\text{A}}$	11 – 19
VG (%)	$35,05 \pm 4,6$	$35,89 \pm 4,7$	$36,4 \pm 5,1$	$34,85 \pm 3,2$	$37,88 \pm 5,2$	32 – 52
VGM (fL)	$40,58 \pm 3,4^{\text{a}}$	$41,89 \pm 3,4^{\text{b}}$	$42,1 \pm 2,4$	$41,26 \pm 3,2$	$44,62 \pm 4,6$	34 – 58
CHGM (%)	$33,34 \pm 1,5$	$33,07 \pm 1,6$	$32,52 \pm 1,5$	$32,97 \pm 1,5$	$33,89 \pm 2,1$	31 – 37
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	$184,1 \pm 70,7$	$190,2 \pm 55,8$	$197 \pm 41,1$	$189,9 \pm 65,7$	$180,7 \pm 59,3$	100 – 350

Letras iguais representam médias iguais, letras diferentes indicam diferença estatística, $p<0,05$:

^{ab}entre animais positivos e negativos e ^{AB} entre sorovares e animais negativos.

*Jain (1993).

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Os resultados encontrados na avaliação do leucograma estão representados na Tabela 2. Houve somente diferença estatística para eosinófilos entre animais positivos e negativos ($p<0,05$), mas se encontram dentro dos valores de referência.

Tabela 2 - Valores médios \pm desvio padrão do leucograma conforme sorologia positiva e negativa para *Leptospira* spp. e separadamente pelos sorovares de maior prevalência.

Leucograma	Negativos (n=113)	Positivos (n=94)	Bratislava (n=35)	Icterohaemorrhagiae (n=22)	Grippotyphosa (n=11)	Valores de referência *
Leucócitos totais (/µL)	8979 \pm 2282	9295 \pm 2205	10016 \pm 2370	9117 \pm 1659	9730 \pm 1637	5500 - 12500
Segmentados (/µL)	4804 \pm 1501	5070 \pm 1490	5550 \pm 1633	4961 \pm 1270	5682 \pm 1209	2700 - 6700
Linfócitos (/µL)	3670 \pm 1630	3608 \pm 1336	3769 \pm 1348	3306 \pm 1218	3592 \pm 996	1500 - 5500
Eosinófilos (/µL)	315 \pm 302 ^a	412 \pm 386 ^b	441 \pm 379	524 \pm 517	313 \pm 146	0 - 950
Basófilos (/µL)	46 \pm 85	72 \pm 127	94 \pm 167	105 \pm 138	55 \pm 66	0-170
Monócitos (/µL)	141 \pm 154	128 \pm 127	156 \pm 182	121 \pm 82	107 \pm 73	0-800

Letras iguais representam médias iguais, letras diferentes indicam diferença estatística, p<0,05

*Jain (1993).

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Os valores de proteína plasmática total (PPT) e fibrinogênio não apresentaram diferença estatística entre animais positivos e negativos (Tabela 3). Em relação ao fibrinogênio, podemos observar que o sorovar *L. Grippotyphosa* apresentou valores um pouco acima do intervalo de referência para a espécie. Não houve diferença estatística significativa (p=0,08) entre este sorovar e os animais soronegativos.

Tabela 3 - Valores de proteína plasmática total e fibrinogênio conforme sorologia positiva e negativa para *Leptospira* spp. e separadamente pelos sorovares de maior prevalência.

	Negativos (n=113)	Positivos (n=94)	Bratislava (n=35)	Icterohaemorrhagiae (n=22)	Grippotyphosa (n=11)	Valores de referência*
PPT (g/dL)	6,78 \pm 0,68	6,87 \pm 0,65	6,98 \pm 0,54	6,88 \pm 0,87	6,07 \pm 0,45	5,3 - 8,3
Fibrinogênio (mg/dL)	340,7 \pm 62,2 ^{AB}	313,8 \pm 154,7	293,7 \pm 154,3 ^B	350 \pm 146,6 ^{AB}	466,6 \pm 163,2 ^A	100 - 400

^{AB} Letras iguais representam médias iguais, letras diferentes indicam diferença estatística, p=0,08

*Kaneko (2008).

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Os valores da fragilidade osmótica eritrocitária com 50% de hemólise dos eritrócitos, não tiveram diferença estatística entre os equinos negativos e positivos para *Leptospira* spp. e nem entre os diferentes sorovares (Tabela 4).

Tabela 4 - Valores médios \pm desvio padrão expresso como H50 correspondentes à concentração de NaCl com 50% (H50) de hemólise conforme sorologia positiva e negativa para *Leptospira* spp. e separadamente pelos sorovares de maior prevalência.

	Negativos (n=113)	Positivos (n=94)	<i>Bratislava</i> (n=35)	<i>Icterohaemorrhagiae</i> (n=22)	<i>Grippotyphosa</i> (n=11)
H50 (%)	0,53 \pm 0,05	0,53 \pm 0,04	0,50 \pm 0,03	0,57 \pm 0,05	0,53 \pm 0,04

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Em relação aos valores de GSH, houve diferença estatística entre animais negativos e positivos ($p=0,05$), já entre os valores de MDA não houve diferença significativa (Tabela 5).

Tabela 5 - Valores médios \pm desvio padrão de glutatona reduzida eritrocitária (GSH) e malondialdeído (MDA) conforme sorologia positiva e negativa para *Leptospira* spp. e separadamente pelos sorovares de maior prevalência.

	Negativos (n=113)	Positivos (n=94)	<i>Bratislava</i> (n=35)	<i>Icterohaemorrhagiae</i> (n=22)	<i>Grippotyphosa</i> (n=11)
GSH (μmol/g Hb)	5,16 \pm 1,89 ^a	4,54 \pm 2,68 ^b	3,39 \pm 2,6	4,73 \pm 2,89	4,96 \pm 2,65
MDA (nM/g Hb)	0,625 \pm 0,703	0,738 \pm 0,518	0,748 \pm 0,527	0,912 \pm 0,564	0,675 \pm 0,43

Letras iguais representam médias iguais, letras diferentes indicam diferença estatística, $p=0,05$

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Na avaliação bioquímica somente os valores de albumina e glicose foram estatisticamente diferentes ($p<0,01$) entre equinos negativos e positivos para *Leptospira* spp. (Tabela 6).

Tabela 6 - Valores médios \pm desvio padrão de bioquímica clínica conforme sorologia positiva e negativa para *Leptospira* spp. e separadamente por cada sorovar que foram reagentes.

	Negativos (n=113)	Positivos (n=94)	Bratislava (n=35)	Icterohaemorrhagiae (n=22)	Grippotyphosa (n=11)	Valores de referência *
Ureia (mg/dL)	35,00 \pm 8,69	34,66 \pm 9,12	36,53 \pm 9,94	33,35 \pm 8,65	34,11 \pm 10,49	21,4 - 51,4
Creatinina (mg/dL)	1,48 \pm 0,35	1,48 \pm 0,46	1,57 \pm 0,62	1,40 \pm 0,39	1,31 \pm 0,41	1,20 - 1,90
Proteína sérica total (g/dL)	6,76 \pm 0,7	6,84 \pm 0,77	6,94 \pm 0,7	6,9 \pm 0,91	6,64 \pm 0,48	5,20 - 7,90
Albumina (g/dL)	2,45 \pm 0,29 ^a	2,35 \pm 0,26 ^b	2,37 \pm 0,16	2,18 \pm 0,28	2,38 \pm 0,24	2,60 - 3,90
Globulinas (g/dL)	4,30 \pm 0,75	4,49 \pm 0,8	4,56 \pm 0,71	4,71 \pm 0,94	4,30 \pm 0,64	2,60 - 4,00
Fosfatase alcalina (U/L)	222,5 \pm 75,44	226,49 \pm 87,87	232,96 \pm 94,32	248,57 \pm 96,28	190 \pm 61,63	143 - 395
Aspartato aminotransferase (U/L)	297,5 \pm 129,37	278,89 \pm 117,74	276,34 \pm 78,57	258,48 \pm 79,51	287,66 \pm 76,65	226 - 366
Gama glutamiltransferase (U/L)	18,61 \pm 8,78	18,84 \pm 13,0	18,12 \pm 5,04	19,9 \pm 20,6	23 \pm 17,43	4,30 - 13,40
Bilirrubina Total (mg/dL)	1,34 \pm 0,84	1,22 \pm 0,86	0,96 \pm 0,77	1,02 \pm 0,66	1,33 \pm 1,19	1,00 - 2,00
Bilirrubina Direta (mg/dL)	0,31 \pm 0,07	0,31 \pm 0,08	0,3 \pm 0,09	0,33 \pm 0,09	0,24 \pm 0,1	0,00 - 0,40
Bilirrubina Indireta (mg/dL)	1,03 \pm 0,85	0,91 \pm 0,86	0,65 \pm 0,75	0,68 \pm 0,64	1,09 \pm 1,15	0,20 - 2,00
Glicose (mg/dL)	91,2 \pm 16,9 ^{aA}	79,9 \pm 17,8 ^b	75,0 \pm 14,7 ^B	75,9 \pm 15,7 ^B	75,66 \pm 15,6 ^B	75 - 115

Letras iguais representam médias iguais, letras diferentes indicam diferença estatística, $p<0,01$:

^{ab} entre animais positivos e negativos e ^{AB} entre sorovares e animais negativos.

*Kaneko (2008).

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

4 DISCUSSÃO

Poucos são os trabalhos que relatam sobre valores hematológicos e bioquímicos em equinos infectados naturalmente por *Leptospira* spp., o que poderia ser útil para melhor compreensão dos efeitos sistêmicos da infecção. É necessário salientar que as formas subclínicas são muito comuns (HOUWERS et al., 2011). Os animais podem se tornar portadores inaparentes e a eliminação de leptospires, principalmente na urina, serve como fonte de infecção para outros animais e humanos (FAISAL et al., 2012).

No presente estudo foi constatada uma alta prevalência para a *Leptospira* spp. (45,4%) e os animais testados estavam aparentemente saudáveis, sem doença clínica prévia. Estes dados revelaram que a *Leptospira* spp. é altamente prevalente na região analisada e de difícil diagnóstico por se apresentar de forma subclínica. Neste contexto, o diagnóstico da leptospirose

nos animais deve ser baseado na detecção de anticorpos (sorologia) e detecção do agente como reação em cadeia da polimerase (PCR) (OIE, 2015).

Na avaliação do eritrograma foram observadas diferenças nos valores de VGM ($p<0,05$) entre animais positivos e negativos e os valores de hemoglobina, quando realizamos um comparativo entre sorovares. Verificou-se maiores concentrações de hemoglobina para o sorovar *L. Grippotyphosa* ($p<0,05$). Essas diferenças observadas não apresentam relevância clínica, já que os valores se mantiveram dentro do intervalo de referência para a espécie.

Para os valores de fibrinogênio não houve diferença estatística significativa entre os grupos estudados. Pode-se observar valores acima do intervalo de referência para os animais reativos ao sorovar *L. Grippotyphosa*. Aumento das concentrações plasmáticas de fibrinogênio pode indicar processos inflamatórios agudos (THRALL et al., 2015). Nos animais estudados não foram verificadas outras alterações que indicassem algum processo inflamatório agudo.

Quanto aos valores de leucograma, houve diferença estatística nos valores de eosinófilos ($p<0,05$) entre animais positivos e negativos para leptospirose. Entretanto, os valores de mantiveram dentro dos intervalos de referência para a espécie (JAIN, 1993), não possuindo relevância clínica. Pinna et al. (2010), encontrou discreto aumento do número de linfócitos em equinos soropositivos e com histórico de falhas reprodutivas, fato não observado neste trabalho. Essas diferenças ocorreram, provavelmente, pois os animais neste estudo não apresentavam sinais clínicos.

Os dados avaliados no presente estudo não apresentaram diferença estatística para FOE. Apesar de não apresentar diferença estatística, há uma tendência de ocorrer maior fragilidade eritrocitária quando observados os valores para os animais reativos ao sorovar *L. Icterohaemorrhagiae*, no qual foram observados valores maiores de MDA eritrocitário, provavelmente devido aos efeitos deletérios das espécies reativas do oxigênio com consequente lipoperoxidação e constatada pela maior FOE, que contribui com dados em relação ao metabolismo oxidativo na leptospirose subclínica.

Verificou-se diferença estatística nas concentrações de GSH entre animais positivos e negativos para *Lepstospira* spp. ($p=0,05$). Embora não tenha ocorrido diferença significativa nas concentrações do MDA, pôde-se observar um discreto aumento nos valores dos animais positivos. Esses achados podem sugerir a produção de espécies reativas do oxigênio e de peroxidação lipídica. A GSH é um dos principais antioxidantes que age de forma preventiva, evitando que as ERO causem danos às células. Uma de suas funções é neutralizar os produtos gerados durante o processo de peroxidação lipídica. Na presença de ERO, a GSH é oxidada por ação da glutationa peroxidase, diminuindo os níveis circulantes de GSH (HANSCHMANN et

al., 2013). Um nível diminuído de GSH no plasma é o resultado de um aumento na utilização do mesmo, presumivelmente para combater os radicais livres circulantes (KERKSICK e WILLOUGHBY, 2005).

Foi verificado aumento de MDA em bovinos com leptospirose clínica, assim como redução de GSH (ERDOGAN et al., 2008). Deger et al. (2009) demonstraram um aumento da peroxidação lipídica e uma redução da atividade da GSH em equinos naturalmente infectados por *Theileria equi*. Como o presente estudo não utilizou animais com doença clínica, as alterações encontradas são discretas, mas evidenciam que mesmo assim, podem ocorrer alterações no metabolismo oxidativo.

Quanto à avaliação da bioquímica clínica, a diminuição da albumina também pode indicar estresse oxidativo neste estudo. Houve diferença estatística para os valores de albumina entre animais positivos e negativos para *Leptospira* spp. ($p<0,01$). A albumina é uma proteína de fase aguda negativa, entre suas muitas funções biológicas, possui uma atividade antioxidante significativa (BOURDON e BLACHE, 2001; KANEKO et al., 2008). Assim como verificou-se diminuição nas concentrações de GSH, a albumina também pode estar sendo mobilizada para combater radicais livres circulantes. No presente estudo nos animais negativos, a concentração de albumina foi menor que os valores de referência, já as concentrações de globulinas foram maiores. Valores semelhantes já foram descritos em equinos saudáveis (CANCELIER, 2017; TODESCHINI, 2017). Em equinos, a diminuição dos valores de albumina isoladamente não tem correlação com perda de função hepática e estima-se que cerca de 20% dos animais saudáveis manifestam hipoalbuminemia (THRALL et al., 2015).

A atividade de GGT permaneceu sem diferença estatística entre os grupos, mas os valores encontrados estão discretamente acima do intervalo de referência para a espécie (KANEKO et al., 2008). Estes valores, associados aos demais achados, não evidenciaram anormalidades. A GGT é uma enzima que pode estar elevada em lesão hepática aguda, em que sua atividade pode estar com valores de 5 a 30 vezes acima do normal (THRALL et al., 2015) e no presente estudo não chegou a duas vezes o valor superior de referência.

A concentração de glicose foi estatisticamente maior nos animais negativos para *Leptospira* spp. ($p<0,01$). Como os valores se mantiveram dentro dos valores de referência para espécie (KANEKO et al., 2008), provavelmente essa diferença seja oriunda de um achado ocasional.

Pesquisadores observaram que equinos com sororreatividade para o sorovar *L. Bratislava*, mesmo na presença de problemas reprodutivos, não apresentaram alteração

consistentes ou importantes para os valores de hematologia e bioquímica sérica (PINNA et al., 2010), assim como os resultados encontrados neste estudo.

5 CONCLUSÃO

Em conclusão, equinos soropositivos para *Leptospira* spp., sem sinais clínicos, não apresentaram nenhuma alteração consistente ou grave para hematologia, valores bioquímicos séricos ou do metabolismo oxidativo, não sendo um bom parâmetro para diagnóstico nestes animais. Sendo assim, a detecção de anticorpos se apresenta como uma ferramenta eficiente para o diagnóstico da leptospirose nos animais. Mais estudos devem ser conduzidos para identificar se esta é uma condição estável, ou se em determinados períodos a doença pode manifestar formas clínicas.

Mesmo não indicando indícios de infecção por *Leptospira* spp. em animais soropositivos sem sinais clínicos, os exames laboratoriais são de extrema importância para descartar outras alterações ou doenças que possam estar ocorrendo com determinado indivíduo.

6 REFERÊNCIAS

- ADLER, B. Pathogenesis of leptospirosis: cellular and molecular aspects. **Vet Microbiol**, v. 172, n. 3-4, p. 353-8, Aug 27 2014.
- ARTIUSHIN, S. C. et al. Real-time PCR for detection of *Leptospira* interrogans serovar Pomona type kennewicki in equine clinical specimens. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, p. 53, 2012.
- BENZIE, I. F. F. Lipid Peroxidation: a review of cases, consequences, measurements and dietary influences. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 47, p. 233-261, 1996.
- BEUTLER, E. Glutathione. In: (Ed.). **Red cell metabolism: a manual of biochemical methods**. 3. Orlando: Grune e Stratton, 1984. p.131-134.
- BOURDON, E.; BLACHE, D. The importance of proteins in defense against oxidation. **Antioxid Redox Signal**, v. 3, n. 2, p. 293-311, Apr 2001.
- CANCELIER, C. D. L. **Hematologia, bioquímica e metabolismo oxidativo em éguas gestantes da raça crioula**. 2017. 64 p. (Dissertação de Mestrado). Centro de Ciências Agroveterinárias - CAV, Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC, Lages - SC.

DE BRITO, T.; SILVA, A. M. G.; ABREU, P. A. E. Pathology and pathogenesis of human leptospirosis: a commented review. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 60, n. 23, p. 1-10, 2018.

ELIAS, F. et al. Fragilidade osmótica eritrocitária em gatos acometidos por hepatopatias e gatos com insuficiência renal. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 413-418, 2004.

ELLIS, W. A. Animal leptospirosis. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 387, p. 99-137, 2015.

ERDOGAN, H. M. et al. Serum sialic acid and oxidative stress parameters changes in cattle with leptospirosis. **Vet Res Commun**, v. 32, n. 4, p. 333-9, Apr 2008.

FAISAL, S. M.; MCDONOUGH, S. P.; CHANG, Y.-F. Leptospira: invasion, pathogenesis and persistence. In: ME, E. (Ed.). **The pathogenic spirochetes: strategies for evasion of host immunity and persistence**. New York, NY: Springer Science, 2012. p.143-172.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

HAMOND, C.; MARTINS, G.; LILENBAUM, W. Subclinical leptospirosis may impair athletic performance in racing horses. **Trop Anim Health Prod**, v. 44, n. 8, p. 1927-30, Dec 2012.

HANSCHMANN, E. M. et al. Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins--molecular mechanisms and health significance: from cofactors to antioxidants to redox signaling. **Antioxid Redox Signal**, v. 19, n. 13, p. 1539-605, Nov 1 2013.

HOUWERS, D. J. et al. Agglutinating antibodies against pathogenic Leptospira in healthy dogs and horses indicate common exposure and regular occurrence of subclinical infections. **Vet Microbiol**, v. 148, n. 2-4, p. 449-51, Mar 24 2011.

JAIN, N. C. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. New York: Academic press, 2008.

KERKSICK, C.; WILLOUGHBY, D. The antioxidant role of glutathione and N-acetyl-cysteine supplements and exercise-induced oxidative stress. **J Int Soc Sports Nutr**, v. 2, p. 38-44, Dec 9 2005.

LYKKESFELDT, J.; SVENDSEN, O. Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. **Vet J**, v. 173, n. 3, p. 502-11, May 2007.

MACHADO, L. P. et al. Susceptibilidade eritrocitária ao estresse osmótico em equinos da raça Árabe: efeito do exercício, treinamento e suplementação com vitamina E. **Revista Universidade Rural Série Ciências da Vida**, v. 27, p. 134-136, 2007.

MCCULLOCH, C. E.; SEARLE, S. R. **Linear and generalized linear mixed models**. New York: Wiley, 2001.

PARPART, A. K.; LORENZ, P. B.; ET AL. The osmotic resistance (fragility) of human red cells. **J Clin Invest**, v. 26, n. 4, p. 636-40, Jul 1947.

PINNA, M. et al. Seropositivity to *Leptospira interrogans* serovar Bratislava associated to reproductive problems without significant biochemical or hematological alterations in horses. **Ciência Rural**, v. 40, n. 10, p. 2214-2217, 2010.

SANT'ANA, V. A. C.; BIRGEL, E. H.; MOURÃO, G. B. Fragilidade osmótica dos eritrócitos de bovinos das raças Holandesa, Girolando e Gir, criados no Estado de São Paulo. **Ciência rural**, v. 31, n. 4, p. 609-614, 2001.

SCHALM, O. W.; SMITH, R; KANEKO, J. J. **Plasma protein: fibrinogen ratios in dogs, cattle and horses**. Part 1. Influence of age on normal values and explanation of use in disease. California Veterinarian, v. 24, p. 9-11, 1970.

THRALL, M. N. et al. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. 1590 p.

TODESCHINI, P. R. B. **Avaliação hematológica, bioquímica e do metabolismo oxidativo em equinos da raça crioula submetidos à prova simulada de laço comprido**. 2017. 36 p. (Dissertação de Mestrado). Centro de Ciências Agroveterinárias - CAV, Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC, Lages-SC.

COSIDERAÇÕES FINAIS

A distribuição homogênea por todas as regiões do estado de Santa Catarina de aglutininas anti-*Leptospira* encontradas no soro dos equinos evidenciou a susceptibilidade destes animais à diversos sorovares de *Leptospira* spp. Entretanto, sugere-se que estudos adicionais devem ser realizados para identificar outras possíveis causas de problemas reprodutivos em equinos no estado de Santa Catarina.

Os achados apresentados neste estudo mostraram uma alta frequência da infecção por *Leptospira* spp. em equinos na região da Serra Catarinense, revelando a necessidade de medidas emergenciais de vigilância para o controle desta importante zoonose nos plantéis de equinos. Além disso, chama-se a atenção para a necessidade de novos estudos destinados a orientar a atualização das cepas vacinas utilizadas comercialmente, uma vez que estas na sua maioria não contemplam todos os sorovares circulantes.

Os principais fatores de risco associados a soropositividade nas propriedades estudadas foram relacionados ao contato com outras espécies animais como bovinos e capivaras, principalmente, regime de criação extensivo e histórico de suspeita da doença na propriedade.

Os equinos soropositivos para *Leptospira* spp. não apresentaram nenhuma alteração consistente ou grave para hematologia, valores bioquímicos séricos ou do metabolismo oxidativo. Os métodos tradicionais de exames de rotina para diagnóstico não evidenciaram indícios de uma infecção por *Leptospira* spp. em animais sem sinais clínicos, os equinos se apresentaram sem sintomatologia ou histórico de sinais compatíveis com alguma doença. Sendo assim, a técnica baseada na detecção de anticorpos (sorologia) se apresenta como uma ferramenta eficiente para o diagnóstico da leptospirose nos animais.

Como sugestão, quando há suspeita de leptospirose na propriedade recomenda-se realizar o diagnóstico através de sorologia, identificando o sorovar prevalente e confirmado a suspeita. Posteriormente, recomenda-se tratar os animais positivos com antibióticos a base de estreptomicina, seguido da vacinação do plantel com alguma vacina que contemple os sorovares predominantes na propriedade.

Medidas efetivas de controle contra roedores nas propriedades são de extrema importância, pois estes são conhecidos como importantes hospedeiros de manutenção da doença, disseminando-a e contaminando o ambiente e outras espécies animais.