

Isolamento de Leptospira em feto equino abortado**Isolation of Leptospira in an aborted equine fetus**

DOI:10.34117/bjdv6n8-604

Recebimento dos originais: 08/07/2020

Aceitação para publicação: 26/08/2020

Caroline Dewes

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

Instituição: Universidade Federal de Pelotas – UFPel

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

E-mail: caroldewesvet@hotmail.com

Tanise Pacheco Fortes

Doutora pelo Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas

Instituição: Universidade Federal de Pelotas – UFPel

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

E-mail: tanisefortes@gmail.com

Paula Soares Pacheco

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

Instituição: Universidade Federal de Pelotas – UFPel

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

E-mail: paulassoarespacheco@gmail.com

Gilmar Batista Machado

Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas

Instituição: Universidade Federal de Pelotas – UFPel

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

E-mail: gilmar.machado84@hotmail.com

Fernanda Maria Pazinato

Doutora pelo Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas

Instituição: Universidade Federal de Pelotas – UFPel

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

E-mail: fernandampazinato@hotmail.com.br

Amilton Clair Pinto Seixas Neto

Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas

Instituição: Universidade Federal de Pelotas – UFPel

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

E-mail: amiltonseixas@gmail.com

Flávia Aleixo Vasconcellos

Doutora pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas

Instituição: Universidade Federal de Pelotas – UFPel

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

E-mail: aleixo.fv@gmail.com

Éverton Fagonde da Silva

Docente da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas

Instituição: Universidade Federal de Pelotas – UFPel

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

E-mail: fagondee@gmail.com

RESUMO

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

Palavras-chave: Leptospirose, MAT, Virulência, Equinos de charrete.**ABSTRACT**

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

Keywords: Leptospirosis, MAT, Virulence, Cart horses.**1 INTRODUÇÃO**

A leptospirose em equinos ocorre em todo o mundo, a qual possui importantes consequências econômicas (Ellis, 2015). A prevalência da enfermidade e a presença dos sorovares que causam a doença variam consideravelmente entre os países (Verma *et al.*, 2013). Embora a apresentação subclínica da doença seja a mais comum nessa espécie animal, a leptospirose equina apresenta manifestações clínicas normalmente associadas com complicações reprodutivas, queda na performance, perda de peso e manifestações oculares (Ellis, 2015).

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

sinotrópicos dos municípios. No município de Pelotas (RS), em um estudo sorológico realizado com equinos de tração, a prevalência encontrada foi de 28,57% em animais com título maior ou igual a 400, com o sorovar Canicola sendo o mais prevalente (Dewes et al 2020).

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

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

Este relato descreve um aborto em uma égua no município de Pelotas (RS), onde foi possível isolar leptospiros, caracterizar a virulência do isolado em modelo animal e realizar uma caracterização genotípica preliminar da cepa isolada.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Uma égua adulta com aproximadamente nove (9) anos de idade, abortou durante o exame clínico de rotina. Na anamnese, o proprietário relatou informações sobre o local onde a égua era mantida, o contato com outros animais (principalmente com cães e roedores) e que possuía um histórico de retorno ao cio, natimortos e aborto. O proprietário informou também que a égua era utilizada para tração, percorrendo vários locais da cidade de Pelotas (RS) durante a coleta de materiais recicláveis em uma charrete. Após o aborto, o sangue da égua foi coletado para sorologia e o feto foi encaminhado para a necropsia no setor de patologia da Faculdade de Veterinária da UFPel. Durante a necropsia, foi realizada a coleta de um volume de 5 mL de sangue fetal e um fragmento de 5 cm³ de um dos rins do animal.

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

Após o isolamento, a partir do cultivo da amostra do rim do feto, a caracterização molecular preliminar da cepa isolada foi realizada a partir de PCR, utilizando como molde o DNA genômico extraído e oligonucleotídeos que amplificam os genes LipL32, LigB e SecY. Como controle positivo, utilizou-se o DNA da cepa Fiocruz L1-130. Cada reação foi realizada em um volume final de 25 µl, 12,5 µl de mix (PCR Master Mix – Promega), 9,5 µl de água ultrapura, 1 µl de cada oligonucleotídeo e 1 µl de DNA genômico. A reação foi submetida a um processo de desnaturação inicial (94°C, 5 min), seguido por 35 ciclos de desnaturação (94°C, 1 min), anelamento (55°C, 1 min) e extensão (72°C, 1 min). Após os 35 ciclos, a reação foi submetida a um ciclo final de extensão a 72°C por 10 min. Para avaliação do resultado, as amostras foram aplicadas em gel de agarose e submetidas à eletroforese em cuba horizontal. O gel foi visualizado sob luz UV. Paralelamente, as culturas positivas foram inoculadas em dois hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos, oriundos do Biotério Central da UFPel, com 4 semanas de idade, através da inoculação intraperitoneal de 10⁸ leptospiras. Quando os animais apresentaram sinais clínicos compatíveis com a doença clínica, foram eutanasiados e os rins usados para reisolamento da cepa em meio EMJH semi-sólido. Todos os procedimentos realizados com os hamsters foram aprovados pela CEEA/UFPel (Processo nº 23110.004657/2010-84).

O MAT foi realizado na amostra de sangue da égua utilizando como antígeno os seguintes sorovares: *L. interrogans* Pomona Pomona, *L. interrogans* Icterohaemorrhagiae RGA, *L. kirschneri* Grippotyphosa Moskva V, *L. santarosai* Bataviae Swart, *L. interrogans* Australis Ballico, *L. interrogans* Australis Bratislava, *L. interrogans* Pyrogenes Salinem, *L. interrogans* Sejroe Hardjoprajitno, *L. interrogans* Copenhageni M20, *L. interrogans* Autumnalis Akiyami A, *L. biflexa* Semarang Patoc 1, e os isolados locais *L. interrogans* Canicola Kito e *L. borgpetersenii* Ballum 4E. Para o teste, as leptospiras foram cultivadas em meio comercial EMJH (Difco laboratories) líquido, em uma temperatura de 29°C e repicadas a cada sete dias, até a concentração em 1-2 x 10⁸ leptospiras/ mL. Para a realização do MAT, as amostras de soro foram inicialmente diluídas em

1:50 em PBS estéril, pH 7,2, e o teste foi considerado reagente quando houve aglutinação de 50% ou mais das leptospiros em relação ao controle.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amostra de sangue da égua, a qual foi coletada após o aborto, revelou o seguinte resultado:

- *L. kirschneri* Grippytyphosa Moskva V (1:800); *L. borgpetersenii* Ballum 4E(1:800); *L. interrogans* Sejroe Hardjoprajitno (1:400); e *L. santarosai* Bataviae Swart (1:200).

Quando o cultivo da cepa apresentou um crescimento de 10^8 leptospiros/mL, foi realizada a extração do DNA genômico, seguida pela PCR. A amplificação de lipL32, ligB e SecY foi realizada com sucesso, onde a amplificação de lipL32 e ligB, confirmou a que a cepa é patogênica, uma vez que estes genes só estão presentes em cepas patogênicas. Por outro lado, a amplificação de SecY permite o posterior sequenciamento e o alinhamento com múltiplas sequencias disponíveis no banco de dados (GenBank).

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

Estudos sorológicos da leptospirose em equinos no Brasil e no mundo apontam para uma ocorrência de aglutininas anti-leptospiros variável entre os países e uma ampla suscetibilidade dos animais em relação aos sorovares predominantes (Verma *et al.*, 2013). Embora o sorovar Bratislava seja considerado como o mais prevalente em equinos no mundo (Ellis, 2015) e indicado como um sorovar adaptado a espécie equina (Bharti *et al.*, 2003), outros sorovares como Pomona, Grippytyphosa, Icterohaemorrhagiae, Autumnalis, Serjoe, Canicola e Ballum também são associados com a doença (Hartskeerl *et al.*, 2004; Dewes *et al.*, 2020). Entretanto, o sorovar leptospiral mais associado com aborto em éguas é o Pomona (Verma *et al.*, 2013).

Em nosso relato, o MAT realizado com a amostra de sangue da égua, a qual foi coletada no mesmo momento do aborto, revelou reações com maiores títulos para os sorogrupos Grippytyphosa e Ballum, seguido de reações com os sorovares Hardjo e Bataviae. Esse resultado é coerente com os demais estudos sorológicos realizados no Brasil e no mundo, embora seja evidente a ausência de

reações contra Icterohaemorrhagiae, Canicola e Pomona, mesmo que o proprietário tenha relatado que a égua teve contato com caninos e roedores sinantrópicos na propriedade (Dewews *et al.*, 2020). Os sorogrupos Grippotyphosa e Ballum estão associados com mamíferos sinantrópicos e silvestres, como os camundongos e os marsupiais (Bharti *et al.*, 2003), os quais podem ser encontrados no ambiente urbano e na periferia do município de Pelotas (RS).

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

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

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

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

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES, CNPq e a FAPERGS pelas bolsas de estudo e pelos demais auxílios financeiros para a execução deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- BHARTI, A. R.; NALLY, E. J.; RICARDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; LEVETT, P. N.; GILMAN, R.H.; WILLIG, M. R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet Infectious Diseases*, v.3, p.757–71, 2003.
- DEWES, C.; FORTES, T. P.; MACHADO, G. B.; PACHECO, P. S.; SILVA, J. P. M.; SEIXAS NETO, A. C. P.; FÉLIX, S. R.; SILVA, É. F. Prevalence and risk factors associated with equine leptospirosis in an endemic urban area in Southern Brazil. *Brazilian Journal of Development*, v.6, n.8, p.58380- 58390, 2020.
- ELLIS, W.A. Animal leptospirosis. *Current Topics Microbiology and Immunology*, v.387, p.99-137, 2015.
- FINGER, M.A.; BARROS FILHO, I.R.; LEUTENEGGER, C.; ESTRADA, M.; ULLMANN, L.S.; LANGONI, H.; KIKUTI, M.; DORNBUSH, P.T.; DECONTO, I.; BIONDO, A.W. Serological and molecular survey of *Leptospira* spp. among cart horses from an endemic area of human leptospirosis in Curitiba, Southern Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.56, n.6, p.473-6, 2014.
- FREITAS, D.C.; LACERDA, J.P.G.; SALLES GOMES, C.E.; LIMA, F.P. Notas sobre leptospirose equina. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.27, p.93-6, 1960.
- HAMOND, C., MARTINS, G.; MEDEIROS, M. A.; LILENBAUM, W. Presence of Leptospiral DNA in Semen Suggests Venereal Transmission in Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.33, p.1157-1159, 2013.
- HARTSKEERL, R.A.; GORIS, M.G.A.; BREM, S.; MEYER, P.; KOPP, H.; GERHARDS, H.; WOLLANKE, B. Classification of *Leptospira* from the Eyes of Horses Suffering from Recurrent Uveitis. *Journal of Veterinary Medicine B*, v.51, p.110–115, 2004.
- LASTA, C. S.; OLIVEIRA, S. T.; MERINI, L. P.; DASSO, M. G.; PEDRALLI, V.; GONZÁLEZ, F. H. D. Pesquisa de aglutininas anti-*Leptospira* em soros de equinos de tração em Porto Alegre, Brasil. *Revista brasileira de Ciência Veterinária*, v. 20, n. 1, p. 23-25, 2013.
- MARCOLONGO-PEREIRA, C.; ADRIEN, M.L.; LADEIRA, S.R.L.; SOARES, M.P.; ASSIS-BRASIL, N.D.; SCHILD, A.L. Abortos em equinos a região Sul do Rio Grande do Sul: estudo de 72 casos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* v.32, n.1, p.22-26, 2012.
- PESCADOR, C.A.; CORBELLINI, L.G.; LORETTI, A.P.; WUNDER-JUNIOR, E.; FRANTZ, F.J.; DRIEMEIER, D. Aborto equino por *Leptospira* sp. *Ciência Rural*, v.34, n.1, p.271-274, 2004.

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

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

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