

INÊS DE OLIVEIRA SAMPAIO CHAMBEL DINIS

**PESQUISA DE *LEPTOSPIRA SPP.* EM CAVALOS
CLINICAMENTE SAUDÁVEIS**

Orientador: Professora Doutora Joana Simões
Co-Orientador: Professora Doutora Adriana Belas

**Universidade Lusófona
Faculdade de Medicina Veterinária**

**Lisboa
2023**

INÊS DE OLIVEIRA SAMPAIO CHAMBEL DINIS

**PESQUISA DE LEPTOSPIRA SPP. EM CAVALOS
CLINICAMENTE SAUDÁVEIS**

Dissertação defendida em provas públicas para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no Curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, no dia 11 de janeiro de 2024, com o Despacho de Nomeação de Júri N° 563/2023, de 27 de dezembro 2023, com a seguinte composição:

Presidente: Prof^a. Doutora Margarida Alves

Arguente: Prof^a. Doutora Clárisse Coelho

Orientador: Prof^a. Doutora Joana Simões

**Universidade Lusófona
Faculdade de Medicina Veterinária**

**Lisboa
2023**

Agradecimentos

Em primeiro lugar, queria agradecer à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. A todos os docentes, funcionários e sobretudo à diretora do curso, Professora Doutora Laurentina Pedroso, pelo exemplar esforço em garantir as melhores condições de aprendizagem.

À Professora Doutora Joana Simões, por ter aceite orientar a minha dissertação e por toda a dedicação e disponibilidade que demonstrou desde o início. Assim como, por todo o apoio e conhecimento transmitido ao longo destes seis anos.

À Professora Doutora Adriana Belas, por ter aceite a corrientação desta dissertação e por toda a sua amabilidade e disponibilidade.

À Doutora Constança Moreira da Fonseca, um agradecimento especial. Pelo sentido de orientação transmitido, a nível profissional bem como pessoal. Por todo o conhecimento, confiança e sobretudo amizade. Por ser, para mim, uma referência no mundo da Medicina Veterinária. Estarei eternamente grata.

A toda à equipa do Jockey, Dr. Nuncio Fragoso, Dr. Rui Mendes, Dra. Filipa Jogular e Dra. Rita Delgado, por todos os ensinamentos transmitidos e por proporcionarem a minha primeira experiência de trabalho na área dos equinos.

A toda à equipa do Hospital Militar de Mafra, pela confiança dada para realizar as diversas funções de forma autónoma. E também às minhas colegas de estágio, Patrícia, Beatriz e Mariana, por toda a interajuda na realização das tarefas.

Aos meus pais, por possibilitarem a realização de um dos meus maiores sonhos. Por todo o apoio incondicional em qualquer etapa da minha vida. Que possa sempre orgulhar-vos.

Ao meu irmão Pedro, por ser uma inspiração como pessoa e irmão mais velho.

Aos meus avós, Dada, Augusta e Daudau, que juntamente com os meus pais moldaram a pessoa que sou. Ao meu avô Zé, do qual tenho muitas saudades e que certamente estará orgulhoso de mim.

À minha segunda família, Tia Rosarinho, Tia Nini, Tia Manela, Tio Quim, Tomás, Joaquina e Miguel. Por todos os momentos passados, especialmente de muita felicidade.

Às minhas melhores amigas, Maria, Joana, Teresa, Carol, Rita, por demonstrarem, todos os dias, o verdadeiro significado de amizade e por me apoiarem incondicionalmente. O carinho que sinto por vocês é inexplicável. À Kika também, por ser a mais bela surpresa deste ano.

Ao Miguel, por acima de tudo ser o meu melhor amigo. Por não me deixar ir a baixo nos momentos mais difíceis.

Aos bons amigos que a faculdade me deu, Martim, Alejandro, Tomás, Guigas, Maria por todos os momentos passados, conversas, sessões de estudo e realizações de trabalhos.

Por fim, gostaria de agradecer a todas as pessoas que contribuíram para um dia ser médica veterinária. Obrigada.

Resumo

A leptospirose é uma doença bacteriana provocada pela espiroqueta do género *Leptospira*. É declarada pela Organização Mundial da Saúde como uma zoonose, responsável por um milhão de casos anualmente. Para além do Homem, afeta também animais domésticos e animais selvagens através do contacto com urina de organismos infetados e ambientes contaminados, como águas estagnadas. Em cavalos, a maioria das infeções são assintomáticas, porém quadros clínicos de uveíte recorrente e doença renal foram relatados. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a presença de *Leptospira spp.* em equinos clinicamente saudáveis. Para tal, procedeu-se à colheita de sangue de trinta e quatro cavalos na área da Grande Lisboa e Santarém, utilizando posteriormente a reação em cadeia polimerase quantitativa (q-PCR, do inglês “*Quantative polymerase chain reaction*”) como método de diagnóstico. Foi também realizado um inquérito sobre os fatores de risco associados, assim como informações sobre o manejo de cada exploração visitada. Relativamente aos resultados obtidos neste estudo, o agente patológico não foi detetado em nenhuma das amostras através da técnica de q-PCR.

Palavras chave: leptospira, cavalos, fatores de risco, q-PCR, sangue

Abstract

Leptospirosis is a bacterial disease caused by a spirochete of the genus *Leptospira*. It is declared by the World Health Organization as a zoonosis, responsible for one million cases annually. In addition to humans, it also affects domestic animals and wild animals through contact with the urine of infected organisms and contaminated environments, such as stagnant water. In horses, most infections are asymptomatic, but recurrent uveitis and renal disease have been reported.

The present study aimed to evaluate the presence of *Leptospira spp.* in clinical healthy horses. To this end, blood was collected from thirty-four horses in the Greater Lisbon and Santarém area, subsequently using the quantitative polymerase chain reaction (q-PCR) as a diagnostic method. A survey was also carried out on the associated risk factors, as well as information on the management of each farm visited.

Regarding the results obtained in this study, the pathological agent wasn't detected in any of the samples using the q-PCR technique.

Keywords: leptospira, horses, risk factors, q-PCR, blood

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

%- por cento

mm- milímetros

mL- mililitro

mg/kg- miligrama por quilo

IV- via intravenosa

IM-via intramuscular

PO- via oral

ADN- Ácido desoxirribonucleico

AINEs- Anti-inflamatórios não esteroides

ELISA- Ensaio de imunoabsorção enzimática, do inglês “Enzyme linked immunosorbent assay”

EMJH- Meio de cultura Ellinghousen-MCcullogh-Johnson-Harns

LPS- Lipopolissacarídeos, do inglês “lipopolysaccharides”

MAT- Teste de microaglutinação, do inglês “Microaglutination test”

OMPs- Proteínas da membrana externa, do inglês “Outer membrane proteins”

PCR- Reação em cadeia polimerase, do inglês “Polymerase chain reaction”

q-PCR- Reação em cadeia polimerase quantitativa, do inglês “Quantitative PCR”

URE- Uveíte recorrente equina

Índice

Índice de tabelas	10
Índice de figuras	10
Atividades desenvolvidas durante o estágio	11
I Revisão da literatura	15
1.1 Introdução	15
1.2 Etiologia	15
1.2.1 Taxonomia, Nomenclatura e Classificação	15
1.2.2 Morfologia.....	17
1.3 Epidemiologia	19
1.3.1 Distribuição geográfica.....	19
1.3.2 Modo de infeção e transmissão	20
1.3.2.1 Fatores de risco	21
1.4 Patogenia.....	22
1.5 Quadro clínico.....	23
1.5.1 Doenças reprodutivas- aborto, aspeto da placenta e poldro	23
1.5.2 Doença sistémica em cavalos adultos e poldros	23
1.5.3 Doenças oftalmológicas- Uveíte recorrente equina	25
1.6 Diagnóstico laboratorial de leptospirose	25
1.6.1 Métodos de deteção direta	26
1.6.2 Cultura bacteriana	26
1.6.3 Serologia	27
1.6.3.1 Teste de aglutinação microscópica	28
1.6.3.2 Ensaio de imunoabsorção enzimática	28
1.6.4 Deteção do ADN	29
1.6.4.1 Reação em cadeia polimerase	29
1.6.5 Alterações histopatológicas	30
1.6.6 Diagnóstico de uveíte recorrente equina	31
1.7 Tratamento.....	31
1.7.1 Tratamento de uveíte recorrente equina	32
1.8 Prevenção e controlo.....	33
1.8.1 Vacinação	34
1.9 Impacto da leptospirose na saúde pública	34

II Estudo	35
1. Objetivos.....	35
2. Materiais e métodos	35
2.1 Animais	35
2.2 Colheita de sangue	35
2.3 Detecção de <i>Leptospira spp.</i>	36
2.3.1 Extração do ADN.....	36
2.3.2 Detecção e quantificação de <i>Leptospira spp.</i> por qPCR	36
2.4 Inquérito	37
2.5 Análise estatística dos dados	40
3. Resultados	40
3.1 Análise descritiva	40
3.1.1 Conhecimento sobre a leptospirose	41
3.1.2 Sinais clínicos	41
3.1.3 Vacinação	42
3.1.4 Tipo de alojamento	42
3.1.5 Fatores de risco	43
3.1.6 Detecção de <i>Leptospira spp.</i>	43
4. Discussão	44
5. Conclusão	48
Bibliografia	49

Índice de tabelas

Tabela 1. Distribuição dos casos clínicos pelas diferentes áreas clínicas em regime ambulatorio com a Dr ^a Constança Moreira da Fonseca	11
Tabela 2. Distribuição dos casos clínicos pelas diferentes áreas clínicas na Clínica Veterinária Militar de Equinos	13
Tabela 3. Reagentes e respetivas medições para a preparação da mistura reacional para a deteção de <i>Leptospira spp.</i>	37
Tabela 4. Frequência absoluta e relativa sobre a questão 1. Antes deste inquérito já tinha ouvido falar em Leptospirose	39
Tabela 5. Frequência absoluta e relativa sobre a questão 2. Sabia que esta doença pode afetar pessoas?	39
Tabela 6. Frequência absoluta e relativa sobre a questão 3. Existe algum caso de cegueira na exploração?	40
Tabela 7. Frequência absoluta e relativa sobre a questão 8. Onde é que o cavalo se encontra alojado?	40
Tabela 8. Frequência absoluta e relativa sobre os fatores de risco associados à transmissão e propagação da leptospirose equina	41

Índice de figuras

Figura 1. Ciclo de transmissão de <i>Leptospira spp.</i>	22
--	----

I- Relatório de estágio

O estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária foi realizado na área clínica de equinos desde 15 de setembro de 2022 a 28 fevereiro de 2023 perfazendo um total de 940 horas.

Clínica ambulatória privada: Horsecare

A primeira fase do estágio curricular decorreu de 15 de setembro a 23 de dezembro de 2022 (total de 600 horas) sob orientação da Dr^a Constança Moreira da Fonseca.

A autora acompanhou a médica veterinária em regime ambulatório, observando e auxiliando em diversas abordagens diagnósticas e terapêuticas. Ao longo dos quatro meses foram acompanhados no total 207 casos clínicos referentes a cavalos, pôneis e alguns asininos.

Tabela 1- Distribuição dos casos clínicos pelas diferentes áreas clínicas em regime ambulatório com a Dr^a Constança Moreira da Fonseca.

Área clínica	Número de casos
Profilaxia e identificação	70
Ortopedia	39
Odontologia	35
Gastroenterologia	4
Reprodução	3
Pneumonologia e otarrinolarngiologia	3
Neurologia	1
Cardiologia	1
Parasitologia	5
Oftalmologia	3
Urologia	3
Lacerações	3
Dermatologia	15
Reabilitação	10
Bem-estar e nutrição do cavalo atleta	4
Exame em ato de compra	5
Total	207

Ao observar a tabela 1 é possível concluir que as áreas mais abordadas, no decorrer do estágio, foram a profilaxia e identificação, a ortopedia e a odontologia. Os procedimentos de profilaxia (desparasitação e vacinação) e de identificação (colocação de microchip e a realização do resenho em poldros), assim como os procedimentos de odontologia (nivelamento da arcada dentária, extração do dente de lobo e remoção de tártaro) foram realizados de forma rotineira, de forma a garantir a saúde e bem-estar do equídeo, e não apenas em casos de queixa clínica. Casos clínicos de ortopedia foram observados com bastante frequência, sendo realizados exames de claudicação com o objetivo de identificar o membro afetado e localizar a lesão. Os exames clínicos desta especialidade incluíram a realização de testes de flexão, bloqueios perineurais e intra-articulares, radiografias e ecografias. Quando considerado benéfico, a médica veterinária aconselhou o tutor do cavalo a realizar um protocolo de reabilitação com base no uso de laserterapia (do inglês *LASER - light amplification by stimulated emission of radiation*).

Relativamente à área de dermatologia, foram acompanhados casos de dermatofitose com uma certa regularidade. O tratamento baseou-se na lavagem de todas as áreas afetadas com um shampoo de enilconazol (Imaverol®) e um antifúngico de dois em dois dias durante duas semanas. Após este período, a médica veterinária reavaliava o caso clínico juntamente com o proprietário do cavalo.

Clínica Veterinária Militar de Equinos

A segunda fase do estágio curricular decorreu entre 2 de janeiro de 2023 e 28 de fevereiro de 2023 (total de 340 horas), sob orientação do Dr. David Couto e com a colaboração dos restantes médicos veterinários da Clínica Veterinária Militar de Equinos localizada na Escola das Armas em Mafra: o Dr. Ricardo Matos, o Dr. Francisco Medeiros, a Dr^a. Joana Rodrigues e o Dr. Gonçalo Camacho.

Ao longo dos dois meses, a autora acompanhou 45 casos clínicos em cavalos adultos e poldros estabulados nas instalações do exército português. Na tabela 2 é possível verificar a distribuição do número total de casos pelas diferentes áreas de clínica.

Tabela 2- Distribuição dos casos clínicos pelas diferentes áreas clínicas na Clínica Veterinária Militar de Equinos.

Área clínica	Número de casos
Ortopedia	12
Traumatologia e cuidados de enfermagem	12
Gastroenterologia	3
Odontologia	3
Dermatologia	10
Cirurgia	3
Total	43

Assim, as áreas de clínica mais abordadas foram a ortopedia, a dermatologia e a área de traumatologia e cuidados de enfermagem. Nos casos de ortopedia foram realizados exames de claudicação, testes de flexão, bloqueios perineurais e intra-articulares, ecografias e radiografias. Na área de dermatologia foram abordados casos de dermatofitose. Recorreu-se ao uso de shampoo de enilconazol (Imaverol®) durante um período intermitente de dois dias até as áreas afetadas já não apresentarem crosta. Por último, na área de traumatologia e cuidados de enfermagem foi realizada a limpeza de feridas limpas, limpas-contaminadas e contaminadas. As mesmas foram limpas com clorexidina e posteriormente, quando necessário, foi realizada a aplicação de antibiótico tópico (Bacitracina®).

Relativamente à área de cirurgia, a autora teve a oportunidade de acompanhar três cirúrgias: uma castração, uma neurectomia do nervo digital palmar bilateral dos membros torácicos e a remoção de uma massa de etiologia desconhecida na zona do pescoço. Nas mesmas, a autora auxiliou o Dr. David Couto na área de anestesia geral, desde a monitorização dos parâmetros vitais no decorrer de cada cirurgia, como também na administração de fármacos antes, durante e após.

II- Estágio Laboratorial- Extracurricular

Para a deteção de *leptospira spp.* nas amostras colhidas, foi realizado pela autora um estágio laboratorial extracurricular no Laboratório da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona.

Na primeira fase foi efetuada a extração do ácido desoxirribonucleico (ADN) das amostras de sangue e seguidamente foi realizada a deteção e qualificação da bactéria através da reação

em cadeia polimerase quantitativa. A autora teve ainda oportunidade de aprofundar o seu conhecimento na área laboratorial ao realizar certas tarefas tais como o manuseamento adequado das amostras biológicas e o uso de materiais específicos nomeadamente pipetas graduadas para dosagem automática.

I Revisão da literatura

1.1 Introdução

A leptospirose é um problema global, tanto na saúde pública, como na medicina veterinária (Adler & Moctezuma, 2010). Esta doença é provocada por bactérias Gram - negativas pertencentes ao género *Leptospira* (Bharti et al., 2003), hospedadas nos túbulos renais de diversas espécies, incluindo bovinos, equinos, cães e porcos (McVey, Kennedy, Chengappa & Wilkes, 2022). Esta doença é comum em áreas tropicais e subtropicais, podendo o agente etiológico sobreviver por longos períodos de tempo em condições húmidas (Khurana et al., 2016).

De acordo com O'Toole et al., 2015, as manifestações clínicas agudas da leptospirose em humanos, denominada também de doença de Weil, são graves e incluem sintomas como febre, icterícia e insuficiência renal. Por sua vez, os animais domésticos também podem desenvolver os mesmos sinais clínicos descritos e a doença pode potencialmente ser fatal (O'Toole, Pathak, Toms, Gelding & Sivaprakasam, 2015). Adicionalmente, os cavalos podem apresentar também uveíte recorrente equina e baixa performance (Verma, Soto, Illanes, Ghosh & Fuentealba, 2012; Hamond, Martins & Lilenbaum, 2012).

Segundo Lukashenko & Novikova, 1947, o primeiro caso de leptospirose em cavalos foi relatado na Rússia em 1947. A doença foi associada a aborto e a uveíte recorrente, porém também foram citados episódios de doença renal e hepática (Hines, 2007).

Na maioria dos casos, a doença é contraída pelo contacto com urina de animais infetados ou pela exposição a um ambiente contaminado (McVey, Kennedy, Chengappa & Wilkes, 2022). Nas áreas rurais, animais domésticos e selvagens são descritos como sendo os potenciais propagadores de leptospirose, enquanto nas cidades os ratos e cães são considerados os principais reservatórios (Levett, 2001; Meites et al., 2004).

1.2 Etiologia

1.2.1 Taxonomia, Nomenclatura e Classificação

A leptospirose é uma doença bacteriana provocada por espiroquetas do género *Leptospira* (Dhanze, Kumar, Suman & Mane, 2013), pertencentes à ordem Spirochaetales, família Leptospiraceae e classe Spirochaetes (Sharma & Yadav, 2008).

Inicialmente foram considerados dois sistemas de classificação no que diz respeito à taxonomia da bactéria (Levett, 2001; Levett et al., 2010). No sistema de categorização sorológica convencional proposto por Wolf e Broom em 1954, as leptospirosas patogénicas e

saprófitas foram categorizadas com base na aglutinação, após absorção cruzada com antígeno homólogo (Wolff & Broom, 1954). Com base neste sistema, denominado de classificação fenotípica, o género *Leptospira* divide-se em duas espécies: *L. interrogans* e *L. biflexa*, patogénica e saprófita, respetivamente (Quinn et al., 2002; Tappero, Ashford & Perkins, 2000; Levett, 2001).

Atualmente, a abordagem clássica de classificação foi substituída por um sistema de classificação genotípico baseado na homologia do ácido desoxirribonucleico (Heins, 2014), e os sorovares de cada espécie são identificados por meio das reações sorológicas (Palaniappan et al., 2006; Cerqueira et al., 2009; Adler et al., 2010; Levett et al., 2010). Com isto, foram abrangidos todos os sorovares das espécies *L. interrogans* e *L. biflexa* (Levett, 2001), perfazendo um total de 250 serovares em 24 sorogrupos (Palaniappan et al., 2006; Cerqueira et al., 2009; Adler et al., 2010; Levett et al., 2010).

A compreensão da diversidade genética dentro do género *Leptospira* foi conseguida através de estudos moleculares que utilizaram a hibridização ADN-ADN (Letocart, Baranton & Perolat, 1997). Sete novas espécies foram propostas, levando a um novo sistema de categorização (Yasuda et al., 1987), tais como: *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. meyeri*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. weilii* e *L. wolbachii* (Arent, Pardyak, Dubniewicz, Plachno & Kotula-Balak, 2022). Posteriormente, foram propostas mais cinco espécies de *Leptospira*: 1, 2, 3, 4 e 5 (Brenner et al., 1999). Em homenagem a Aaron D. Alexander, os autores sugeriram o nome *Leptospira alanderi* para a espécie 2 (Arent et al., 2022). As restantes espécies foram renomeadas em 2007, no Comité Internacional de Taxonomia de *Leptospira* no Equador (Smythe et al., 2013). O comité sugeriu renomear a espécie 1 para *Leptospira alstonie*, a 3 para *Leptospira vanthielii*, a 4 para *Leptospira terpstrae* e a 5 para *Leptospira yanagawae* (Levett, Smythe, 2008; Smythe et al., 2013). A hibridização ADN-ADN tem sido então o padrão predileto para a determinação de espécies, como mencionado anteriormente (Arent et al., 2022).

O aumento do número de isolamentos de leptospira nos últimos anos, principalmente a partir de amostras ambientais, também contribuiu para o conhecimento da sua diversidade (Chaiwattananrungruengpaisan et al., 2018). Assim, foram identificadas quarenta e cinco novas espécies de leptospira (Casanovas-Massana et al., 2020, 2021; Korba et al., 2021; Masuzawa et al., 2018). Atualizações sobre a taxonomia estão disponíveis online no site da <http://bigsd.bpasteur.fr/leptospira> (Guglielmini et al., 2019; Arent et al., 2022).

As leptospirosas patogénicas são tipicamente encontradas em roedores, a temperaturas entre os 20 e os 35°C com uma arquitetura celular semelhante às bactérias gram-negativas (Benacer, Who, Zain, Amran & Thong, 2013). *L. interrogans*, *L. weilii*, *L. noguchii*, *L.*

borgpetersenii (Yasuda et al., 1987), *L. kirschneri* e *L. santarosai* (Dos Santos et al., 2017) são exemplos de espécies pertencentes ao grupo patogénico (Samrot et al., 2021).

Embora a maioria da atual taxonomia bacteriana seja baseada na diversidade genética, a determinação sorológica das estripes de leptospira ainda é extremamente importante. Em primeiro lugar, é crucial para o diagnóstico e direção de vacinação e em segundo lugar, também auxilia na compreensão da patogenia da doença e da posterior reação do sistema imunológico de cada animal (Arent et al., 2022).

1.2.2 Morfologia

A leptospira é uma bactéria longa, fina, altamente móvel e em forma de espiral (Adler & Montezuma, 2010). Em relação às suas dimensões, esta espiroqueta apresenta um diâmetro médio de 0,1 µm, um comprimento que pode variar entre os 0,1 e os 20 µm e uma amplitude helicoidal entre os 0,1 e os 0,15 µm (Goldstein & Charon, 1990; Faine et al., 1999; Levett, 2001). Morfologicamente, a leptospira saprófita não consegue ser distinguida da leptospira patogénica, nem mesmo por microscopia de campo escuro (Arent et al., 2022). É uma bactéria aeróbia obrigatória, com uma temperatura ideal de crescimento entre os 28 e os 30°C e um pH entre os 7,2 e os 7,6 (Palmer & Zochowski, 2000; Adler & Montezuma, 2010). A relação entre a humidade da superfície do solo e a água é responsável pela persistência da bactéria no meio ambiente. A mesma pode sobreviver cento e oitenta e três dias em solos saturados de água, mas apenas trinta minutos em solos secos (Levett, 2001). Segundo Radostits et al., 2002, a leptospira sobrevive um maior período de tempo em águas paradas do que em águas com corrente.

No que se refere à sua estrutura, é semelhante à das bactérias gram negativas, sendo constituída por uma membrana externa, intermédia e interna (Adler & Moctezuma, 2010). A primeira é formada por lipopolissacarídeos (LPS, do inglês “*lipopolysaccharides*”) e proteínas (OMPs, do inglês “*outer membrane proteins*”), que constituem o antígeno primário da leptospira (Haake & Zuckert, 2015), e apresentam um papel importante na sua virulência (Nahori et al., 2005). A segunda camada contém peptidoglicanos que conferem rigidez (Levett, 2001). As proteínas da membrana externa servem como barreira e também são importantes para a ingestão de nutrientes para o crescimento da bactéria (DiRienzo, Nakamura & Inouye, 1978).

No entanto, ao contrário dos outros géneros de espiroquetas, a leptospira possui LPS à superfície (Adler & Moctezuma, 2010), especificamente LipL32 e LipL44 (Mcvey, Keenedy, Chengappa & Wilkes, 2022). A lipoproteína L32 é responsável por induzir uma resposta

inflamatória no hospedeiro, devido à produção significativa de mediadores inflamatórios ao redor das células renais (Yang et al., 2002). Esta lipoproteína também é utilizada como gene e antígeno em meios de diagnóstico, tais como a reação em cadeia polimerase (PCR, do inglês “*Polymerase chain reaction*”) e o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA, do inglês “*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*”), o que aumenta a sensibilidade e a especificidade diagnóstica dos meios utilizados para a detecção de infecções por leptospira (Ahmed et al., 2012; Tarigan et al., 2016). Em todas as espécies patogênicas de leptospira, a proteína da membrana externa L1 (OmpL1) funciona como uma porina (Shang et al., 1995; Dong et al., 2008). A grande especificidade da resposta do anticorpo IgG para OmpL1 permite a fácil distinção de outras doenças, contribuindo para resultados positivos fidedignos através do teste de aglutinação microscópica (MAT) (Fernandes et al., 2012).

A ligA, ligB e a ligC são as três principais classes de imunoglobulinas leptospirais (Matsunaga et al., 2003; Palaniappan et al., 2002, 2004). Os genes que codificam as proteínas imunoglobulinas codificam também os componentes que conferem às leptospirosas patogênicas a sua virulência (Fernandes et al., 2012). A maioria das espécies de leptospira, incluindo *L. weilli*, *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. borgpetersenii* e *L. noguchii* apresentam ligB, o mais clinicamente relevante dos três (Fernandes et al., 2012). No entanto, a ligA também está presente em algumas espécies como *L. interrogans* e *L. kirschneri* (Fernandes et al., 2012). Algumas espécies, tais como *L. weilli*, *L. interrogans* e *L. kirschneri* apresentam igualmente a proteína imunoglobulina do tipo C (Cerqueira et al., 2009). Diversos estudos relataram a utilização das proteínas Lig (do inglês, “*Leptospiral immunoglobulin-like proteins*”) como marcadores para o diagnóstico precoce de leptospirose (Corda et al., 2007), bem como para o desenvolvimento de vacinas (Koizum & Watanabe, 2004). No entanto, a camada que se encontra ao redor das leptospirosas apresenta uma ação endotóxica substancialmente menor que as restantes bactérias gram negativas (Arent et al., 2022).

Ao contrário da maioria das bactérias, a leptospira apresenta dois flagelos que se localizam horizontalmente no espaço periplasmático, entre a membrana externa e a camada de peptidoglicanos (Levett, 2001), ancorados em extremidades opostas da célula (Fraga et al., 2011; Samrot et al., 2021). De acordo com a sua arquitetura celular, o flagelo periplasmático é constituído pelo filamento, o gancho flexível e o complexo basal (Picardeau et al., 2017).

Para além de serem essenciais para a mobilidade translacional e não translacional, também são responsáveis por conferir forma à bactéria através do seu citoesqueleto (Plank & Dean, 2000; Fraga et al., 2011). O tipo de mobilidade escolhido pela leptospira depende da viscosidade do meio em que flutuam, ou seja, utiliza principalmente as extremidades semelhantes a ganchos em meios não viscosos, no entanto em condições viscosas, o movimento adquirido é similar a um parafuso (Takabe et al., 2017). A patogenicidade está

correlacionada com a mobilidade celular, ou seja, uma diminuição na mobilidade reduz a virulência desta espiroqueta (Ottemann & Lowenthal, 2002; Xu, Koizumi & Nakamura, 2020). As leptospirosas patogênicas podem ainda crescer em biofilmes na natureza com consequente aumento (cerca de cinco vezes mais) da sua tolerância a antibióticos (Bierque et al., 2020). Logo, a sobrevivência e persistência da leptospira são consideravelmente favorecidas pela formação de biofilmes, aumentando assim, a sua taxa de transmissão (Bierque et al., 2020). Como resultado, epidemias prolongadas são comuns e ocasionalmente estendem-se por diversas áreas geográficas (Mohd et al., 2018; Dierks et al., 2018).

1.3 Epidemiologia

1.3.1 Distribuição geográfica

Embora a leptospirose seja uma das principais zoonoses a nível mundial (Guerrant et al. 2006), a infeção é mais comum em países com clima quente e/ou tropical (Mcvey, Keenedy, Chengappa & Wilkes, 2022). Em cavalos, a infeção aguda da doença ocorre sobretudo durante as estações chuvosas como a primavera e o outono (Gilger & Hollingsworth, 2017). Porém, foi também observado um padrão sazonal, existindo uma maior proporção de títulos positivos durante os meses de verão (Pikalo et al., 2016). Os serovares *L.interhaemorrhagiae*, *L.canicola*, *L.pomona*, *L.hardjo* e *L.grippotyphosa* estão presentes em todos os continentes exceto na Antártida (Yadeta, Michael & Abdela, 2016).

Embora o número de casos de leptospirose humana na Europa tenha aumentado nos últimos anos, no caso dos cavalos existe uma insuficiência demarcada de estudos epidemiológicos (Frellstedt, 2009; Adler & Moctezuma, 2010; Malalana, Stylianides & McGowan, 2015).

Estudos sorológicos realizados em diferentes países europeus indicaram que a exposição à leptospirose é generalizada (Malalana, Blundell, Pintchbeck & McGowan, 2017). Seroprevalências entre os 9,4 e os 41,9% foram relatadas em equinos saudáveis, recorrendo ao uso de testes de microaglutinação (MAT, do inglês *microagglutination test*) como meio de diagnóstico (Houwers et al., 2011; Pikalo et al., 2016; Malalana, Blundell, Pintchbeck & McGowan, 2017). No entanto, em países como Itália, a seroprevalência foi inferior a este intervalo (1,5%) (Ebani, Bertelloni, Pinzauti & Cerri, 2012) e na Irlanda do Norte superior ao mesmo (72,2%) (Ellis, Bryson, O'Brien & Neill, 1983). Por sua vez, na República Checa, a ocorrência de inundações foi associada à ocorrência de picos endémicos (Dupouey et al., 2014). Na Alemanha, foram observadas leptospirosas no humor vítreo, em diversos cavalos durante a realização de vitrectomias para controlo da uveíte recorrente equina (Wollanke, Gerhards, Brem, Meyer & Kopp, 2004; Niedermaier, Wollanke, Hoffmann, Brem & Gerhards, 2006; Brandes, Wollanke, Niedermaier, Brem & Gerhards, 2007). Outro estudo relatou a

presença de leptospira em 32,2% das amostras de líquido intraocular em 501 cavalos de diferentes países europeus, nomeadamente Suíça, Holanda, Alemanha, Áustria, Luxemburgo, Inglaterra, Polónia e Itália (Hartskeerl et al., 2004). Contudo, em 2017, Malalana, Blundell, Pinchbeck e McGowan concluíram que no Reino Unido a incidência de leptospira é substancialmente menor em casos de uveíte recorrente (6,7%). Na Bélgica, por sua vez, um estudo relatou a presença de leptospira em 30,3% dos casos de uveíte recorrente (Sauvage, Monclin, Elansary, Hansen & Grauwels, 2019). Para além das diferentes condições climáticas presentes em cada país (Malalana, 2019), as divergências no número e no tipo de hospedeiro de transmissão podem explicar as variações na seroprevalência entre as regiões europeias (Divers et al., 2019; Dupouey et al., 2014). Em Portugal, os sorogrupos Australis e Pomona obtiveram as maiores percentagens, 18,5% e 13,8% respetivamente (Rocha & Elis, 2004).

De acordo com estudos realizados em equinos saudáveis, os serovares mais comumente encontrados na Europa são Bratislava e Icterohaemorrhagiae, sendo o cavalo e os roedores os hospedeiros de manutenção, respetivamente (Yadeta, Michael & Abdela, 2016). Grippotyphosa é também um serovar bastante comum em casos de uveíte recorrente (Divers et al., 2019; Dupouey et al., 2014). Contudo, na América do Norte o serovar Pomona encontra-se regularmente envolvido na patogénese da uveíte recorrente equina (Borstel, Oey, Strutzberg-Minder, Boeve & Ohnesorge, 2010).

1.3.2 Modo de infeção e transmissão

As formas de propagação da leptospirose são frequentemente classificadas como diretas ou indiretas. Tendo em conta a causa imediata da infeção, o contacto direto ocorre quando a causa primária de contágio é o tecido e/ou secreções corporais de animais infetados, como a urina. O contacto indireto acontece quando a fonte inicial da doença é uma área contaminada com urina de animais infetados ou portadores (Sehgal, 2006).

Em cavalos, a infeção por *Leptospira spp.* pode ocorrer por contacto direto através de secreções placentárias ou por contacto indireto através de ambientes contaminados (Ebani et al., 2012). Segundo Radostits et al., 2007, um animal infetado pode causar infeção contaminando a água, o pasto e os alimentos com urina, secreções uterinas e produtos de aborto. Porém, o consumo de água contaminada com urina é a principal forma de infeção (Adler & Moctezuma, 2010).

As principais portas de entrada são feridas ou abrasões na epiderme; o contacto com mucosas (incluindo a cavidade oral) (Mcvey, Keenedy, Chengappa & Wilkes, 2022) e o sistema

respiratório, através da inalação de aerossóis que causam inflamação da mucosa (Silverstein, 1953; Katz, Rudoy & Sasaki, 1993).

Os animais podem ser classificados como hospedeiros de manutenção ou hospedeiros acidentais em casos de leptospirose (Levett, 2001; Radostits et al., 2006; Heins, 2014). Segundo Babudieri (1958), um hospedeiro de manutenção ou reservatório é descrito como sendo uma espécie em que a infeção é endémica, transmitindo-se por contacto direto entre animais. Apresenta ainda uma elevada suscetibilidade à infeção, sendo a doença tipicamente subclínica ou moderada, uma vez que a bactéria apresenta uma baixa patogenicidade para este tipo de hospedeiros (Radostits et al., 2006; Heins, 2014). São ainda capazes de excretar leptospirosas durante dias, meses ou anos através da urina (Radostits et al., 2006; Heins, 2014; Foley & Straub, 2017). Os roedores, *Rattus spp.*, são considerados o principal reservatório de leptospirose (Tilahun, Reta & Simenew, 2013).

Por outro lado, um hospedeiro acidental apresenta uma baixa suscetibilidade à infeção, mas uma alta patogenicidade, resultando em quadros clínicos agudos, por vezes graves, assim como uma elevada produção de anticorpos pós infeção (Heins, 2014; Radostits et al., 2006; Hamond, Pinna, Martins & Lilenbaum, 2013).

Segundo Levett, 2001, os animais podem ser considerados hospedeiros de manutenção para alguns serovares e hospedeiros acidentais para outros. Assim sendo, os serovares são frequentemente encontrados em diferentes espécies e diversos estudos epidemiológicos indicam que essas preferências podem mudar ao longo do tempo e entre regiões geográficas (Heins, 2014).

1.3.2.1 Fatores de risco

Em relação aos fatores de risco de transmissão e propagação da infeção, deve ser tido em conta pastoreio partilhado com bovinos ou suínos não vacinados, acesso a fontes de água contaminadas como rios, lagos ou águas de drenagem e o contacto com roedores e animais selvagens (Radostits et al., 2006; Adler & Moctezuma, 2010; Dwyer, Crockett & Kalsow, 1995). A idade, o género e o tipo de manejo são variáveis adicionais que também podem contribuir para a ocorrência da leptospirose (Båverud, Gunnarsson, Engvall, Franzén & Egnevall, 2009). No que diz respeito ao género, está descrito que cavalos castrados e éguas apresentam uma seropositividade superior para Bratislava (Båverud et al., 2009). Por último, cavalos mantidos e tratados individualmente apresentam uma seropositividade inferior do que equinos mantidos em grupo (Lees & Gale, 1994).

A transmissão pode ainda ser afetada pela densidade populacional, pela temperatura, pelo tipo e grau de interação entre os hospedeiros acidentais, os meios de contaminação e os hospedeiros de manutenção (Mcvey, Keenedy, Chengappa & Wilkes, 2022).

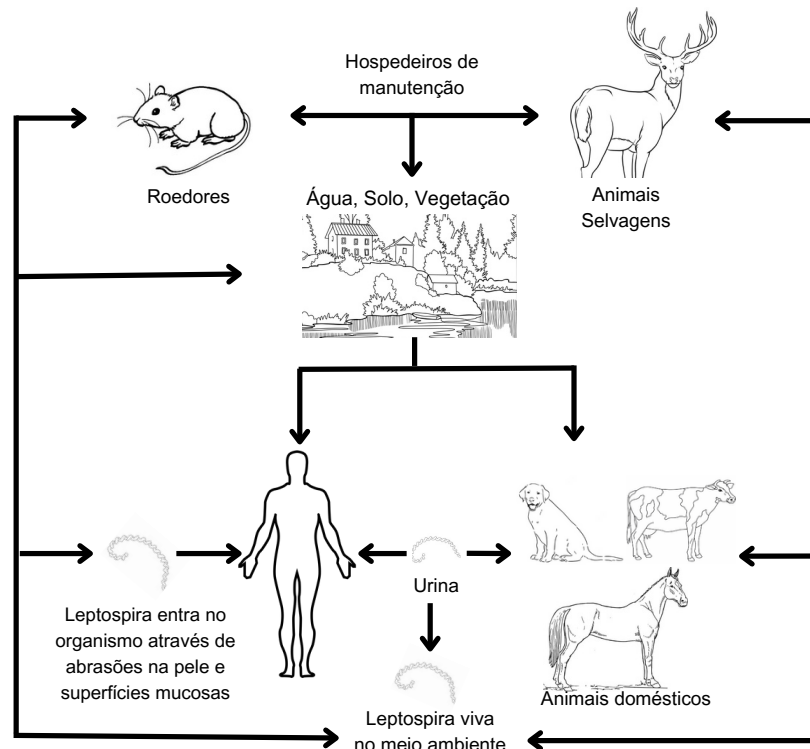


Figura 1. Ciclo de transmissão da leptospira spp. (Adaptado de Faisal et al., 2012)

1.4 Patogenia

De acordo com Hamond et al. (2013) os estudos sobre as especificidades da fisiopatologia da leptospirose em cavalos são insuficientes.

A leptospira entra no organismo através das membranas, como a conjuntiva (Adler & Moctezuma, 2010), a mucosa oral, a mucosa nasal, ou ainda através de abrasões e feridas na pele (Langston & Heuter, 2003; Hines, 2014; Adler & Moctezuma, 2010). A secreção de enzimas líticas ativas (Adler e Moctezuma, 2010), assim como o movimento helicoidal da bactéria (Lambert et al., 2012), são os mecanismos responsáveis pelo processo de entrada do agente patológico no hospedeiro (Hamond et al., 2013). O resultado da exposição à leptospira depende da dosagem, da virulência da bactéria e da suscetibilidade do hospedeiro (Hines, 2014).

Seguidamente, a bactéria entra na circulação sanguínea (Faine et al., 1999), alojando-se em diferentes órgãos como no baço, no fígado, nos olhos e também no sistema nervoso central

e aparelho reprodutor (Langston & Heuter, 2003). Consequentemente ocorre rutura tecidual, isquémia e necrose (Hines, 2014; Adler & Moctezuma, 2009). *Leptospiras* virulentas podem ainda causar apoptose in vitro e in vivo (Estavoyer JM et al., 1991). Este período, denominado de leptospirémia, pode durar até uma semana (Adler & Moctezuma, 2010) e termina com o desenvolvimento de anticorpos, que são geralmente detetados quatro a oito dias após a infeção (Gilger & Hollingsworth, 2017). A fase clínica aguda da doença corresponde a este período e é comum, sobretudo, em animais jovens (Adler & Moctezuma, 2010).

Posteriormente, as bactérias são eliminadas rapidamente do sangue e da maioria dos órgãos através da ação dos anticorpos produzidos pelo sistema imunitário do hospedeiro (Kriston-Piggot & Prescott, 1987; Mcvey, Keenedy, Chengappa & Wilkes, 2022). Assim sendo, o diagnóstico de infeção aguda em cavalos raramente é realizado, pois o quadro clínico inicial é ligeiro, breve e provavelmente subclínico (Houwens et al., 2011).

As leptospiras demoram cerca de duas semanas para atingir as células tubulares proximais e o lúmen tubular renal (Greene, Skyes, Moore, Goldstein & Schultz, 2006). As bactérias permanecem hospedadas e reproduzem-se, podendo ser excretadas pela urina durante dias, meses ou até anos (Langston & Heuter, 2003; Skyes, Hartmann, Lunn, Moore, Stoddard & Goldstein, 2010). Este fenómeno ocorre, pois, leptospiras presentes nos túbulos renais proximais são resistentes aos anticorpos circulantes (Radostits, Gay, Hinchcliff & Constable, 2006). Além disso, os níveis de anticorpos séricos em animais que apresentam infeção crónica diminuem significativamente (Radostits, Gay, Hinchcliff & Constable, 2006).

Podem igualmente ser encontradas no útero de éguas gestantes causando infeções uterinas (Adler & Montezuma, 2010). Por conseguinte, as mesmas causam abortos, patologias neonatais e/ou nadomortos (Adler & Montezuma, 2010). A permanência de leptospiras nos ovidutos e no útero de éguas não gestantes e no aparelho reprodutor de garanhões também foi documentado (Oliveira et al., 2007).

1.5 Quadro clínico

Apesar de na maioria dos casos a apresentação da leptospirose em cavalos ser subclínica (Gilger & Hollingsworth, 2017, Houwens et al., 2011, Adler, 2015), estão descritas quatro situações clínicas distintas: doenças reprodutivas, doença clínica hépato-renal aguda, doença respiratória e doença oftalmológica (Hamond et al., 2013). Os serovares Pomona e Icterohaemorrhagiae são frequentemente associados a sinais clínicos agudos e a surtos de leptospirose em equinos (Hamond et al, 2013; Di Azevedo & Lilenbaum, 2022)

1.5.1 Doenças reprodutivas- abortos, aspeto da placenta e poldro

A leptospirose equina pode resultar em abortos, nado-mortos e poldros fracos à nascença (Hamond et al., 2013). Pode ainda causar infeção dos órgãos reprodutivos, em reabsorção fetal ou neonatos prematuros (Whitwell et al., 2009; Timoney et al., 2011; Verma, Stevenson & Adler, 2013).

Abortos por leptospira podem ocorrer em qualquer mês de gestação, porém geralmente ocorrem a partir do sexto mês (Henis, 2007; Timoney et al., 2011; Foote et al., 2012). Infeções placentárias são responsáveis por um terço dos nado-mortos e mortes neonatais, sendo a infeção bacteriana a causa em 75% dos casos (Whitwell et al., 2009). A placenta apresenta um aspeto edematoso e hemorrágico (Heins, 2014) e em alguns casos pode ocorrer funisite (Sebastian et al., 2005). A infeção de éguas gestantes parece ser secundária quando as estripes causam sinais clínicos reprodutivos e podem terminar em placentite, aborto ou mortalidade fetal (Divers, Chang, Irby, Smith & Carter, 2019). Assim, as leptospiras podem ser facilmente encontradas em tecidos fetais e maternos (Poonacha et al., 1993; Erol et al., 2015). A leptospirose foi também associada a falha reprodutiva em éguas recetoras em todas as fases da gestação, afetando negativamente os programas de transferência de embriões, principalmente devido a mortalidade embrionária precoce (Pinna, Martins, Souza & Lilenbaum, 2014; Pinna, Martins & Lilenbaum, 2012).

1.5.2 Doença sistémica em cavalos adultos e poldros

Apesar da exposição à leptospirose em equinos seja comum, a presença de doença sistémica parece ser rara (Heins, 2014).

Os sinais clínicos de leptospirose equina aguda são muito semelhantes aos observados em outros animais, tais como febre, apatia e anorexia (Verma, Setevenson & Adler, 2013). A presença de icterícia, anemia, petéquias na mucosa e letargia são sinais típicos de infeções mais graves (Verma, Setevenson & Adler, 2013). Podem também apresentar insuficiência renal aguda, principalmente em poldros (Verma, Setevenson & Adler, 2013). Problemas respiratórios como hemorragias pulmonares e pneumonia, também foram relatados após a realização de exercício (Baverud et al., 2009; Hammond et al., 2011; Broux et al., 2012).

1.5.3 Doenças oftalmológicas- Uveíte recorrente equina

A causa mais comum de cegueira em cavalos é a uveíte recorrente equina, também designada por cegueira da lua ou oftalmia periódica (Schwink, 1992; Paglia, Miller & Dubielzig, 2004). Alguns cavalos podem desenvolver URE dois a oito meses após o início da infeção (Adler & Moctezuma, 2010; McVey et al., 2022).

Na maioria dos casos, a URE é dividida em episódios recorrentes de inflamação intraocular e em episódios de remissão sem inflamação intraocular ativa (Gilger & Hollingsworth, 2017). As infeções agudas ocorrem ao oitavo dia e são caracterizadas por apresentarem títulos de anticorpos para, pelo menos, um dos serogrupos principais. Sendo estes Pomona, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa, Canicola, Hardjo e por vezes, Bratislava e Autumnalis (Morter, Herschler, Fessler & Lavignette, 1964).

Miose, bleferoespasmio, fotofobia, epífora, hiperemia conjuntival periférica e irite são sinais clínicos de URE (Radostits, Gay, Hinchcliff & Constable, 2006; Heins, 2014). Cronicamente pode ocorrer formação de catarata, coriorretinite, alteração da cor da íris e eventualmente cegueira (Heins, 2014). Contudo, mesmo em casos mais graves os cavalos podem não apresentar sinais de desconforto, tornando difícil o diagnóstico (Gilger et al., 2010; Gilger & Micahu, 2004).

À medida que a doença progride, a câmara anterior pode desenvolver hifema, miose, fibrina organizada e a córnea pode tornar-se opaca e vascularizada (Wada et al., 2003).

A raça Appaloosa e cavalos de tração apresentam uma elevada predisposição para inflamação, mesmo sendo de baixo grau (Gilger et al., 2010; Gilger & Micahu, 2004). Contudo, em cavalos de sangue quente (Warmbloods) e outros cavalos europeus ocorre uma elevada prevalência de inflamação excessiva limitada ao vítreo, retina e coroide (Schwink, 1992; Allbaugh, 2017; Gilger, 2010).

1.6 Diagnóstico laboratorial de leptospirose

A interpretação dos sinais clínicos e dos resultados dos exames laboratoriais realizados em cavalos com suspeita de leptospirose é considerado um verdadeiro dilema (Foley & Straub, 2017).

O meio de diagnóstico adequado para a deteção e identificação de leptospira spp. depende de diversas variáveis, principalmente do estágio de infeção e da colheita de amostras suficientes (Adler, 2015). Atualmente, o agente patogénico pode ser encontrado diretamente por observação, por cultura ou através da deteção do seu ADN (Adler, 2015).

Alternativamente, pode ser detetado de forma indireta através de métodos de sorologia (Adler, 2015).

1.6.1 Métodos de deteção direta

Devido a ser difícil observar leptospiros por meio de microscopia de campo claro, uma vez que coram levemente ou podem mesmo não corar, a microscopia de campo escuro é considerada o método de eleição de identificação (Quinn, Markey & Carter, et al., 2022; Zuemer, 2010). As bactérias vivas de forma delgada e extremidades em forma de gancho são visualizadas em amostras como sangue, urina, líquido cefalorraquidiano (LCR, do inglês “cerebrospinal fluid”) e leite (Heins, 2014). No entanto, a urina é considerada a amostra de preferência, pois as leptospiros são excretadas pela mesma para o meio ambiente, geralmente duas semanas após o início da infeção (Heins, 2014). Por outro lado, a microscopia de amostras de sangue apenas é útil durante os primeiros dias da infeção, na fase de bacterémia (Levett, 2001).

Em relação ao procedimento de recolha é aconselhável administrar furosemida (1mg/kg IM) e coletar a urina na segunda micção (Nerving & Garrett, 1979). A amostra deve ser analisada vinte minutos após a recolha, devido às bactérias degradarem-se rapidamente. No caso das leptospiros que já se encontram mortas, recomenda-se adicionar formol, de modo a preservar a sua morfologia (Heins, 2014). Para uma boa visualização do microrganismo e das suas características, são necessárias cerca de 10^4 bactérias por mililitro de amostra (Mcvey, Kennedy, Chengappa & Wilkes, 2022). Assim, este método é considerado um meio de diagnóstico sensível e inespecífico (Heins, 2014; Yadeta, Michael & Abdela, 2016). No entanto, para melhorar a sensibilidade da microscopia são aplicadas diversas técnicas de coloração. A coloração de Warthin-Starry é um corante de prata modificado e é o mais frequentemente utilizado (Levett, 2001; Heins, 2014).

Se o serovar for identificado neste tipo de método, deve-se realizar posteriormente uma cultura bacteriana ou uma das diversas técnicas de sorologia (Heins, 2014; Yadeta, Michael & Abdela, 2016).

1.6.2 Cultura bacteriana

Apesar da cultura bacteriana apresentar 100% de especificidade, a sua sensibilidade costuma ser relativamente baixa (Adler & Moctezuma, 2010; Regan & Sykes, 2019).

A cultura de sangue e de urina são as mais comuns para isolar e observar a bactéria *Leptospira spp.* as amostras de sangue devem ser obtidas nos primeiros quatro a dez dias de

doença e devem ser manuseadas o mais rapidamente possível. Contudo, nem sempre é possível. Por essa razão, as amostras devem ser diluídas na proporção 1:10 com albumina de soro de bovino a 1% ou nos próprios meios de cultura (Heins, 2014). O meio ácido oleico-albumina Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) é o mais utilizado (Ellinghausen McCullough, 1965; Johnson & Harris, 1967; Heins, 2014; Mcvey et al., 2022). As amostras podem também ser conservadas no frio, mas não devem ser congeladas (Weil, 1886).

As culturas devem ser incubadas entre 28°C e 30°C, em ambientes escuros (Yadeta, Michael & Abdela, 2016) até vinte seis semanas e inspecionadas a cada sete/dez dias utilizando microscopia de campo escuro (Adler & Moctezuma, 2010). O tempo necessário para detetar crescimento bacteriano numa cultura de *Leptospira spp.* depende do serovar e do número de microrganismos vivos presentes na amostra (Adler & Moctezuma, 2010). No caso dos serovares Pomona e Grippothyphosa, a incubação dura cerca de dez dias (Yadeta, Michael & Abdela, 2016). No entanto, a incubação do serovar Icterohaemorrhagiae dura cerca de duas semanas (Adler & Moctezuma, 2010). As culturas podem ser mantidas vivas por subcultura repetida (Waitkins, 1986) ou armazenadas em meios de agar sólido contendo hemoglobina (Faine, Adler, Christopher & Perolat, 1999). A longo prazo a conservação das culturas pode ser realizada por liofilização (Annear & Marrocco, 1977) ou a -70°C (Alexander et al., 1972). Os meios de cultura inoculados devem ser protegidos de possíveis meios de contaminação, sendo necessária a adição de agentes antimicrobianos selecionados para inibir o crescimento de agentes contaminantes (Ko, Goarant & Picardeau, 2009).

1.6.3 Serologia

A identificação de anticorpos específicos produzidos pelos hospedeiros em resposta a infeções bacterianas é realizada por meio de testes serológicos (Barcellos, Marques, Mores, Centenaro & Sobestiansky, 2009).

Os principais grupos de anticorpos circulantes primários são os IgM e os IgG (Barcelos et al., 2009). Os anticorpos da classe IgM são os primeiros a serem manifestados após a infeção, seguidos pelos anticorpos IgG que prevalecem por um maior período de tempo no organismo (Radostits, Gay, Hinchcliff & Constable, 2006).

Um resultado positivo significa a presença de um ou vários anticorpos específicos devido à presença de infeção, vacinação prévia, reações cruzadas (falsos positivos) ou respostas não específicas. Por outro lado, um teste negativo resulta na inexistência de anticorpos ou num título baixo dos mesmos. Assim, animais recentemente infetados podem não ter desenvolvido a soroconversão, sendo soronegativos (Barcelos et al., 2009).

1.6.3.1 Teste de aglutinação microscópica

O teste de Aglutinação Microscópica (MAT, do inglês “Microscopic Agglutination Test”) é considerado o meio de diagnóstico “gold standard” para a leptospirose (Levett, 2001; Adler & Moctezuma, 2010; Mcvey et al., 2022). Porém, esta definição deve ser reconsiderada devido ao número de resultados falso-positivos e falso-negativos obtidos, dependendo do estado de imunização, da fase da doença e da exposição anterior (Mcvey et al., 2022).

Este método é utilizado sobretudo em casos de infeção aguda em hospedeiros acidentais, pois a concentração de anticorpos é maior (Heins, 2014). Por outro lado, em casos crónicos a resposta por parte dos anticorpos é mínima, sendo considerado um teste menos útil na deteção de doença em hospedeiros de manutenção (Radostits, Gay, Hinchcliff & Constable, 2006). Com isto, apresenta uma alta especificidade, mas uma baixa sensibilidade (Heins, 2014).

As leptospiras vivas são cultivadas em meio líquido combinado com o soro do animal para verificar a aglutinação (Skyles et al., 2011). A resposta entre o antigénio da membrana LPS do agente patológico e os anticorpos encontrados no soro do animal formam a base do MAT (Hamond, Pinna, Martins & Lilenbaum, 2013). Independentemente do intervalo de tempo entre as amostras, um aumento do título em quatro vezes ou mais é considerado o diagnóstico final para a leptospirose (Levett, 2001; Chirathaworn, Inwattana, Poovorawan & Suwancharoen, 2014; Lizer et al., 2017). A deteção de títulos de anticorpos pode ocorrer após um período de três a cinco dias no caso de os sinais clínicos serem evidentes (Levett, 2001). Como as bactérias são finas e de tamanho reduzido, a aglutinação é posteriormente avaliada através da microscopia de campo escuro (Yadeta, Michael & Abdela, 2016; Hernández-Rodríguez et al., 2011).

Esta é uma técnica difícil de implementar por serem necessárias culturas vivas de diferentes serovares circulantes de leptospira e pessoal bem equipado e especializado capaz de interpretar corretamente os resultados, o que pode revelar-se dispendioso (Yadeta, Michael & Abdela, 2016; Baburaj, Nandkumar & Khanna, 2006). Assim sendo, existe uma escassez na compreensão da epidemiologia de cada país, tornando difícil incluir os serovares apropriados como antígenos de teste (Hamond, Pinna, Martins & Lilenbaum, 2013).

1.6.3.2 Ensaio de imunoabsorção enzimática

O ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA, do inglês “Enzyme Linked Immunosorbent Assay”) é uma técnica serológica desenvolvida com o objetivo de substituir ou complementar o MAT (Hamond et al., 2012). Inclui a capacidade de distinguir entre infecção aguda e crónica através da deteção de imunoglobulinas específicas, como IgM e IgG (Flannery et al., 2001). Os níveis de anticorpos são tipicamente baixos ou inexistentes nos estágios iniciais da infecção e em termos de diagnóstico os resultados podem ser falsos negativos (Rosa et al., 2017). Para aumentar a especificidade, este meio de diagnóstico foi desenvolvido de modo a identificar anticorpos contra a célula bacteriana, assim como proteínas antigénicas recombinantes específicas na superfície bacteriana (Rosa et al., 2017). Por ser expressa apenas por leptospiros patogénicas, a proteína LipL32 apresenta uma maior relevância (Haake et al., 2000; Dey et al., 2004). Um ELISA positivo para IgM indica a presença de infecção há pelo menos um mês (Hines, 2014).

1.6.4 Deteção do ácido desoxirribonucleico

1.6.4.1 Reação em cadeia polimerase

A reação em PCR é utilizada para amplificar o ADN de *leptospira spp.* de uma variedade de amostras, contudo o serovar infeccioso não consegue ser identificado através deste método. Embora a identificação seja irrelevante para o tratamento clínico, é benéfico para a saúde pública e para estudos epidemiológicos (Heins, 2014).

Os genes da bactéria *Leptospira spp.* podem ser identificados utilizando eletroforese em gel de agarose, de acordo com a técnica de PCR convencional (Villumsen, Pedresen, Krogfelt & Jensen, 2010). No entanto, o PCR em tempo real ou PCR quantitativo (q-PCR, do inglês “*Quantitative PCR*”) é uma técnica baseada na reação em cadeia polimerase convencional, ainda assim é capaz de amplificar e simultaneamente quantificar o ADN alvo (Singh & Roy-Chowdhuri, 2016; Samrot et al., 2021). Ainda, o q-PCR uma técnica que obtém resultados mais rapidamente e é menos suscetível à contaminação (Picardeau, 2013). Segundo Merien, 2005, é extremamente sensível e específico no diagnóstico de leptospirose, mesmo tendo como maior limitação a frequência do aparecimento de resultados falso-positivos. Assim sendo, o desenvolvimento de ensaios de PCR multiplex em tempo real podem ser utilizados para maximizar a especificidade da ligação do ADN, utilizando dois conjuntos de oligonucleótidos em vez de um (Ahmed et al., 2012). Ainda assim, serão necessários mais

estudos no futuro para determinar a sensibilidade e especificidade desta técnica laboratorial (Skyes et al., 2011; Greene, 2012).

Um resultado positivo numa amostra de sangue juntamente com sinais clínicos persistentes sugere fortemente leptospirose aguda. Contudo, um resultado positivo na urina significa excreção renal, tanto em animais com infeção aguda, como em portadores crónicos da doença. No entanto, um resultado negativo não descarta a presença de leptospira no organismo, pois a leptospirose é transitória e a excreção renal pode ser intermitente (Schuller et al., 2015). Em casos de aborto ou parto prematuro é também utilizado como meio de diagnóstico (Whitwell et al., 2009; Timoney et al., 2011; Pinna, Martins, Hamond & Lilenbaum, 2011).

Segundo Branger et al., 2005, e de acordo com a fisiopatologia da leptospirose, o PCR deve ser realizado em sangue na primeira semana após a infeção, sendo mais sensível e específico do que o MAT. Todavia, o teste de aglutinação microscópica continua a ser o principal meio de diagnóstico confirmatório da presença de leptospirose (Midence et al., 2012). Assim sendo, é aconselhado que os resultados obtidos por ambas as técnicas de diagnóstico sejam analisadas detalhadamente tendo sempre em conta o contexto clínico (Schuller et al., 2015).

1.6.5 Alterações histopatológicas

Em relação à histopatologia em cavalos adultos, os principais órgãos observados são o fígado, os rins, os pulmões e o coração. A estrutura geral do fígado não se encontra alterada, mas existe colestase intra-hepática, hipertrofia e hiperplasia das células de Kupffer. Nos rins, a alteração predominante é a nefrite intersticial. O agente patológico pode também estar presentes nos túbulos renais (Radostits, Gay, Hinchcliff & Constable, 2006). As lesões crónicas, por sua vez, são restritas aos rins e consistem em focos cinzentos de dimensões reduzidas, geralmente circundados por um anel de hiperemia (Adler & Moctezuma, 2010). Estas lesões são causadas pelo aumento da nefrite intersticial localizada (Adler & Moctezuma, 2010).

Em fetos abortados ou nado-mortos, macroscopicamente o fígado encontra-se com dimensões aumentadas, sobretudo nos lobos hepáticos, de cor pálida ou amarelada (Sebastian et al., 2005; Adler & Moctezuma, 2010). No exame histopatológico pode existir a presença de necrose hepática e hipertrofia das células de Kupffer (Adler & Moctezuma, 2010). As alterações histopatológicas fetais dependem da espécie, do mês de gestação e do tipo de sorovar infetante (Adler & Moctezuma, 2010). A icterícia pode ser observada nos tecidos subcutâneos de fetos abortados nos últimos meses de gestação (Adler & Moctezuma, 2010). Em fetos nado-mortos, as alterações são semelhantes às causadas por anoxia, como

hemorragias nos pulmões, no coração, bem como na pleura parietal e mesentério (Adler & Moctezuma, 2010). Os rins também se encontram aumentados de tamanho, edematosos com faixas radiais brancas no córtex e na medula (Sebastian et al., 2005).

As lesões encontradas na placenta foram descritas como vasculite, infiltração das células inflamatórias do estroma e das vilosidades e hiperplasia epitelial alantóide (Heins, 2014).

1.6.6 Diagnóstico de uveíte recorrente equina

Em relação ao diagnóstico de uveíte recorrente, é realizado um exame oftalmológico completo de ambos os olhos, mesmo que o comprometimento seja unilateral (Dearo & Souza, 2000). Uma inspeção detalhada da córnea e das pálpebras também é realizada (Gilger, 2017). É também importante reunir um histórico completo de qualquer caso anterior de inflamação, juntamente com uma descrição dos sinais clínicos observados pelo tutor (Gilger, 2017). Um hemograma completo, assim como um painel químico sérico são outros procedimentos de diagnóstico a ter em consideração (Albaugh, 2016).

A produção intraocular de anticorpos combinada com a análise do ADN através da técnica de PCR em tempo real, presente no humor vítreo ou aquoso são os meios de diagnóstico favoráveis para determinar se a URE está associada à presença de *Leptospira spp.* (De Groot-Mijnes et al., 2006). O valor C, denominado também de coeficiente de Goldmann-Witmer, é calculado através do rácio entre o valor do título de anticorpo leptospiral no humor aquoso e o valor do título sérico de anticorpo leptospiral presente no soro. (Frellstedt, 2009; Gilger, 2017). Um valor C maior que um é considerado positivo para a produção de anticorpos leptospira intraoculares (Gilger, 2017). Contudo, um estudo executado em humanos com uveíte ativa de etiologia leptospiral (Robert-Gangneux et al., 2004), sugere um valor C superior a três ou quatro para confirmar a produção de anticorpos intraoculares (Maggs, Lappin & Nasisse, 1999; De Groot-Mijnes et al., 2006).

Por sua vez, meios de cultura não são recomendados para situações clínicas devido à sua reduzida sensibilidade (Polle et al., 2014). Se o olho infetado precisar de ser removido devido a dor persistente e a cegueira, a histologia ocular é realizada para averiguar lesões patognomónicas (Dubielzig et al., 1997).

1.7 Tratamento

O tratamento da leptospirose depende da extensão e persistência dos sinais clínicos, assim como do local de infeção (Heins, 2014). Apesar do tratamento da leptospirose equina ser

semelhante ao dos outros animais, existem muito poucos estudos específicos (Verma, Stevenson & Adler, 2013; Hamond, Pinna, Martins & Lilenbaum, 2013), por isso, os diferentes métodos de tratamento foram extrapolados de outras espécies (Verma, Stevenson & Adler, 2013).

O principal objetivo do tratamento é controlar a infeção antes que danos renais e hepáticos se tornem crónicos (Levett, 2001). Controlar a leptosúria dos animais portadores e torná-los seguros para permanecerem no grupo é o objetivo secundário do tratamento (Radostits, Gay, Hinchcliff & Constable, 2006).

Em cavalos, existem poucos estudos relativos aos antimicrobianos que devem ser utilizados no tratamento de leptospirose (Heins, 2014). O diagnóstico tardio e a localização de leptospiras nos tecidos criam um desafio significativo na determinação da eficácia da antibioterapia (Levett, 2001). Atualmente, os dois antimicrobianos prescritos com maior frequência são a penicilina G na dose de 8mg/kg juntamente com 10mg/kg de diidroestreptomicina sulfato IM uma vez ao dia durante três dias consecutivos e a doxicilina na dose de 10mg/kg PO duas vezes ao dia durante quatro semanas (Allbaugh, 2016; Mcvey, Keenedy, Chengappa & Wilkes, 2022).

A penicilina foi também administrada a éguas gestantes com títulos aumentados de leptospira no final da gestação dando à luz poldros clinicamente saudáveis, embora não existam conclusões suficientes (Bernard et al., 1993). O uso de diidroestreptomicina (50 mg/kg IM cada 24 horas) durante três a cinco dias pode reduzir abortos futuros resultantes de infeção por leptospira em equinos (Naiman et al., 2001), sendo também recomendado em caso de infeção sistémica causada por *Pomona* (Radostits, Gay, Hinchcliff & Constable, 2006).

Segundo Heins, 2014, terapia complementar foi administrada em certos casos, incluindo fluidos intravenosos e furosemida. Cavalos com azotemia pré-renal podem ser inicialmente rehidratados, enquanto a sua função renal é monitorizada (Levett, 2001). Durante os primeiros dias, a vigilância cardíaca também deverá ser realizada (Dupont et al., 1997).

1.7.1 Tratamento de uveíte recorrente equina

Em relação ao tratamento de uveíte recorrente equina, os principais objetivos são preservar a visão, diminuir e controlar a inflamação ocular e também a dor (Gilger & Hollingsworth, 2017). São utilizados anti-inflamatórios (Heins, 2014; Yadeta, Michael & Abdela, 2016), midriáticos (Heins, 2014), corticosteroides e analgésicos tópicos como a atropina a 1% (Yadeta, Michael & Abdela, 2016) aplicada uma a duas vezes por dia (Allbaugh, 2016; Gilger & Hollingsworth, 2017).

Os corticosteroides são aplicados topicamente para reduzir a inflamação (Gilger & Hollingsworth, 2017). Os mais utilizados são a dexametasona HCl 0,1% e o acetato de prednisolona 1% aplicado quatro vezes ao dia (Allbaugh, 2016).

Em relação ao tratamento cirúrgico, a vitrectomia *pars plana* é a abordagem adotada (Toemoerdy, Haessig & Spiess, 2010). Em casos resistentes à terapia, a enucleação é necessária a fim de reduzir permanentemente a dor e a inflamação (Wright, Ireland & Rendle, 2016).

A terapêutica médica pode reduzir e controlar inflamações persistentes, mas por outro lado, não pode prevenir recorrências (Gerding & Gilger, 2016; Gilger & Michau, 2004; McMullen & Fischer, 2017). A antibioterapia sistémica em cavalos com uveíte recorrente equina não apresenta impacto a nível ocular, pois um título positivo pode não significar uma infeção atual, mas sim uma exposição anterior (Gerding & Gilger, 2015).

Apesar do tratamento, em alguns casos os cavalos acabam por perder a visão no olho ou olhos afetados (Gilger & Hollingsworth, 2017).

1.8 Prevenção e controlo

A localização, o número de animais, os serovares infecciosos, os hospedeiros de manutenção, modos de transmissão e fatores de risco devem ser considerados ao desenvolver métodos de controlo (Adler & Moctezuma, 2010). O controlo pode também ser necessário para diminuir o risco de infeção zoonótica (Adler & Moctezuma, 2010).

A leptospirose pode ser controlada através de programas de vacinação; da restrição à exposição de águas paradas e portadores da doença tais como roedores, bovinos, suínos e animais selvagens; do isolamento de animais infetados; da higienização dos locais contaminados; do controlo de roedores (Heins, 2014; Radostits, Gay, Hinchcliff & Constable, 2006); o adequado acondicionamento de alimentos, como em silos e armazéns (Ferreira, 2009); do saneamento e higiene da água para consumo (Wynwood et al., 2014); da realização de testes sorológicos e da inseminação artificial segura (Dhanze, Kumar, Suman & Mane, 2013).

Os animais podem ser vacinados, porém a resposta imune é serovar-específica, transitória e frequentemente não produz imunidade estéril (Radostits, Gay, Hinchcliff & Constable, 2006). No entanto, podem diminuir a gravidade dos sinais clínicos (Lucheis & Ferreira, 2011). Em cavalos, quando a infeção é causada pelo serovar Bratislava, o controlo de tratamento, manejo e imunização do grupo torna-se mais difícil (Pinna et al., 2007).

As estratégias de prevenção da leptospirose geralmente são baseadas na epidemiologia da região, informações de vigilância de levantamentos epidemiológicos e a realização de

diversos meios de diagnóstico (Radostits, Gay, Hinchcliff & Constable, 2006). A identificação do serovar infeccioso, ou pelo menos do serogrupo infeccioso é fundamental para a prevenção e manejo da leptospirose (Pinna et al., 2007).

1.8.1 Vacinação

Atualmente, no mercado europeu, não existe disponível nenhuma vacina disponível para equinos que imunize contra a leptospirose (Malalana,2020). Porém, nos Estados Unidos é utilizada a Lepto Eq Innovator USA (Zoetis Inc, Florham Park, NJ), uma vacina monovalente equina L. Pomona, autorizada e colocada no mercado em outubro de 2015 para prevenir uveíte e abortos associados à leptospira (Malalana, 2020). A sua administração é recomendada em cavalos saudáveis com seis meses de idade ou mais. A vacina provou ser segura em poldros a partir dos três meses de idade, bem como em éguas reprodutoras em todas as fases de gestação. Apesar do número limitado de estudos publicados, os dados sobre abortos por leptospira da Universidade de Kentucky apoiam a eficácia desta vacina (Divers & DeNotta, 2022).

1.9 Impacto da leptospirose na saúde pública

A leptospirose é uma doença zoonótica, identificada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), responsável por um milhão de casos clínicos e mais de 50.000 mortes anualmente (Rajeev, 2022). Em Portugal continental, o número de casos é relativamente inferior em comparação à região autónoma dos Açores onde foram registados casos fatais (Vieira, Gama-Simões & Collares-Pereira, 2006). Condições ambientais, tais como chuvas intensas, inundações, crescimento populacional, saneamento e higiene inadequados, apresentam um impacto significativo na transmissão da leptospira (Rajeev, 2022). O contacto direto ou indireto com urina de um animal infetado é considerado, por alguns autores, como a causa principal de infeção humana (Levett,2001). Assim, ao manusear urina ou objetos contaminados com a mesma, devem ser usadas luvas e áreas contaminadas com urina ou tecidos de um animal infetado devem ser limpas com detergente e desinfetadas com produtos químicos como iodóforos. Produtores de leite, funcionários de matadouros e veterinários apresentam uma maior predisposição para a doença (Heins,2014). Em casos de suspeita de leptospirose equina, até o cavalo apresentar um PCR de urina negativo, o mesmo deve ser manuseado com cuidado, utilizando luvas e protegendo as membranas mucosas (Foley & Straub, 2017).

II Estudo

Este estudo teve a aprovação da Comissão de Ética e Bem-Estar (CEBEA) da Universidade Lusófona, encontrando-se identificado com o número 34-2022. Préviamente à inclusão dos animais no estudo foi obtido o consentimento informado dos proprietários para que fossem realizadas as colheitas de amostras e informações e realizado o processamento dos dados.

1. Objetivos

Os principais objetivos deste estudo foram: (1) avaliar a presença de *Leptospira spp.* em equinos clinicamente saudáveis; (2) identificar quais os fatores de risco para a infeção por *Leptospira spp.* em equinos; (3) verificar se existem diferenças na deteção e quantificação de espécies leptospira em cavalos estabulados e em extensivo.

2. Materiais e Métodos:

2.1 Animais

A população avaliada foi composta por trinta e quatro cavalos adultos (n=34) de diferentes raças e géneros, sendo trinta considerados clinicamente saudáveis após a realização de exame de estado geral pelo médico veterinário assistente. Os animais não tinham história de doença nas últimas semanas de acordo com os proprietários. Todos os cavalos eram residentes na área da Grande Lisboa e Santarém. De acordo com o tipo de alojamento, os animais foram alocados a um dos grupos: estabulado ou paddock. Os animais não apresentavam alteração da capacidade desportiva, nem queixas de doença sistémica nas últimas três semanas.

2.2 Colheita de sangue

Através de venipuntura da veia jugular direita foram colhidos 2ml de sangue, com recurso a uma seringa de 2ml e uma agulha de 0,90 x 44mm, após assepsia do local com álcool etílico a 70%. A amostra foi conservada em tubos de EDTA (do inglês “Ethylenediamine tetraacetic acid”) e refrigerada com placas de gelo até ao transporte para o Laboratório de Microbiologia Faculdade de Medicina Veterinária do Centro Universitário de Lisboa. Seguidamente, foi

realizada a extração do ADN para posterior deteção e quantificação das espécies de leptospira através de qPCR.

2.3. Deteção da *Leptospira spp.*

2.3.1 Extração do ADN

A extração de ADN foi realizada em 200ml de sangue total com o kit NZYTissue gDNA Isolation (MB13502, Nzytech genes and enzymes). A extração de ADN foi realizada de acordo com as instruções do fabricante.

Transferiram-se 200 µL da amostra de sangue para um tubo de Eppendorf. Seguidamente, adicionaram-se 25 µL de solução de Proteinase K e 200 µL de Buffer NL. A amostra foi homogeneizada no vortex e incubada a 56°C em banho maria durante uma hora. Posteriormente, adicionaram-se 210 µL de etanol a 100% à amostra e a mesma foi imediatamente homogeneizada no vórtex.

A mistura preparada anteriormente foi transferida para um NZYSpin Tissue Column, colocado num tubo de colheita de 2ml, o qual foi centrifugado durante um minuto a 11.000 xg/RCF (RCF- “Relative centrifugal force”). A mistura formada foi descartada e o NZYSpin Tissue Column foi colocado num novo tubo de colheita. De seguida, adicionaram-se 500 µL de Buffer NW1 ao NZYSpin Tissue Column, e posteriormente, o mesmo foi centrifugado durante um minuto a 11.000 xg/RCF. Descartou-se a mistura, colocando o NZY Tissue Column no mesmo tubo de colheita.

Adicionaram-se 600 µL de Buffer NW2 ao NZYSpin Tissue Columne sendo o mesmo centrifugado durante um minuto a 11.000 xg/RCF, sendo a mistiura descartada após a centrifugação.

O NZYSpin Tissue Column foi colocado novamente no tubo de colheita e centrifugado durante dois minutos a 11.000 xg/RCF. Por fim, oNZYSpin Tissue Column foi colocado num novo tubo de Eppendorf e foram adicionados 100 µL de Buffer NE diretamente no NZYSpin Tissue Column. A amostra foi incubada durante um minuto à temperatura ambiente e seguidamente centrifugada a 11.000 xg/RCF durante dois minutos para eluir o DNA.

A amostra obtida foi armazenada a -20°C até realização do passo seguinte.

2.3.2 Deteção e quantificação de *Leptospira spp.* por q-PCR

Após a extração de ADN, foi realizada a deteção e quantificação de *Leptospira spp.* por qPCR com o kit Leptospirosis Real-Time PCR (NZYtech genes and enzymes). O procedimento foi

realizado de acordo com as instruções do fabricante, tendo-se preparado a mistura reacional de acordo com o volume estabelecido para uma reação. Os volumes utilizados encontram-se descritos na tabela.

Tabela 3. Reagentes e respetivas medições para a preparação da mistura reacional para a deteção de *Leptospira spp.*

Reagentes	Volume para uma reação (uL)
Lyo NZYSupreme qPCR master mix	10
Lyo <i>Leptospira spp.</i> /IEC PPMIX	2
NTC	3
Volume final	15

Após a preparação da mistura reacional, pipetaram-se 15 µL da mesma em poços individuais, de acordo com a configuração da sua placa experimental. Seguidamente, pipetou-se 5 µL de cada amostra de ADN extraída nos poços individuais de acordo com a configuração da sua placa experimental. O volume final em cada poço foi de 20µL Para o controlo negativo, adicionaram-se 5 µL de NTC no poço individual correspondente, sendo o volume final foi de 20 µL. Para o controlo positivo, adicionaram-se 5 µL de *Leptospira spp.* no poço individual correspondente, sendo o volume final foi de 20 µL.

Seguidamente, colocaram-se as amostras no termociclador, com sistema ótico composto por uma fonte de iluminação ultra-violeta e um detetor de fluorescência. Por fim, realizou-se uma curva padrão para análise quantitativa, utilizando um computador com o *Rotor-Gene Q Software* para a aquisição de dados

2.4 Inquérito

No âmbito deste estudo foi realizado um inquérito dirigido a oito proprietários e/ou tratadores. O mesmo era composto por dezoito questões de resposta fechada e quatro questões de resposta aberta, com o objetivo de avaliar os potenciais fatores de risco associados à leptospirose em equinos. As características da propriedade/centro hípico, assim como o estado de saúde de cada cavalo foram também avaliadas.

As primeiras questões estavam direcionadas para o inquirido sobre o conhecimento da existência da doença e respetiva zoonose, assim como sobre a presença de casos de aborto ou cegueira na exploração. A realização de vacinação contra *Leptospira spp.*, a todos os

cavalos presentes no centro hípico visitados também foi questionada, bem como a existência de meios de controlo de roedores. Em relação aos equinos utilizados para o estudo, a autora questionou os proprietários/tratadores sobre um possível contacto com águas paradas, o tipo de bebedouro utilizado, o local de armazenamento da alimentação de cada animal e a presença de sinais clínicos típicos de leptospirose nos últimos seis meses.

O questionário foi aplicado somente após leitura e assinatura do termo de consentimento pelo inquerido.

Questionário sobre fatores de risco de Leptospirose em equinos

Obrigada pela disponibilidade em responder a este questionário que tem como objetivo avaliar potenciais fatores de risco associados à Leptospirose em equinos. Os dados obtidos serão utilizados para comunicação científica, sendo os mesmos tratados de forma anónima.

A Leptospirose é uma doença que afeta mamíferos, incluindo cães, cavalos e humanos. Ela é causada por uma bactéria que pode provocar lesão renal, hepática ou aborto nos animais afetados. Alguns animais podem ser portadores, eliminando a bactéria na urina, sem terem sinais clínicos.

1. Antes deste inquérito já tinha ouvido falar em Leptospirose?

Não
Sim

2. Sabia que esta doença pode afetar pessoas?

Não
Sim

3. Qual a sua função na exploração?

Proprietário
Equitador
Tratador
Outro: _____

4. Quantos cavalos existem na exploração? ____

5. Já ocorreram abortos na exploração?

Não
Sim

Se sim, em que mês da gestação? Sabe qual a causa?

6. Existe algum caso de cegueira na exploração?

Não
Sim

Se sim, sabe a causa?

7. É realizado algum tipo de vacinação contra a leptospirose?

Não

Sim

Se sim, em quais dos animais?

8. Onde é que o cavalo se encontra alojado?

Boxe

Paddock

Pastagem

9. Os cavalos têm acesso a locais de água parada (charcos, lagos, etc)?

Não

Sim

10. Os cavalos bebem água:

Bebedouro automático

Balde com água

Outro: _____

11. Qual a alimentação do cavalo?

Alimento composto

Feno e/ou Palha

Pastagem

Outro: _____

12. O alimento fornecido é no colado:

Baldes

Redes suspensas

Manjedoura no chão

Outro: _____

13. A alimentação é armazenada:

Local fechado (ratos, cães, gatos, ou outros não têm acesso)

Local exposto (ratos, cães, gatos ou outros têm acesso)

14. Existem roedores ou outros animais silvestres na exploração/picadeiro)

Não

Sim

Se sim, quais? _____

15. Estes animais contactam com o cavalo?

Não

Sim

16. Estes animais têm acesso aos alimentos do cavalo?

Não

Sim

17. Estes animais têm acesso à fonte de água dos cavalos?

Não

Sim

18. É efetuado algum controlo de pragas?

Não

Sim

Se sim, qual? _____

19. Nos últimos 6 meses algum cavalo teve os seguintes sinais clínicos:

Febre

Mucosas amarelas (icterícia)

Problemas urinários (dificuldade em urinar)

Apatia

Intolerância ao exercício

Outro: _____

Obrigada pela disponibilidade em participar neste inquérito!

Gostaria de ser informado dos resultados deste inquérito?

Não

Sim

2.5 Análise estatística dos dados

A elaboração da base de dados foi organizada em folhas de cálculo através do programa informático Microsoft Office Excel 2016. Foi então realizada a análise dos dados obtidos através da estatística descritiva. A mesma concentrou-se na caracterização da amostra mediante a idade e o género. Fatores de risco, manejo e informações da doença também foram considerados.

3. Resultados

A amostra foi constituída por trinta e quatro cavalos, sendo 21 (61,8%) machos e 13 (38,2%) fêmeas. Em relação à idade, a média foi de 16,41 anos e quanto à localização: 4 (11,8%) cavalos eram da região de Sintra, 4 (11,8%) da região da Costa da Caparica, 4 (11,8%) cavalos da Paiã, 2 (5,9%) cavalos de Santo Estevão, 6 (17,6%) da região de Santarém, 6 (17,6%) cavalos de Monsanto, 4 (11,8%) cavalos da Sobreda e 4 (11,8%) cavalos de Alcochete.

3.1 Análise Descritiva

3.1.1 Conhecimento sobre a Leptospirose

Em relação ao conhecimento sobre a doença e a sua potencial propagação, foram realizadas duas questões. Apenas um proprietário sabia que a leptospirose era uma zoonose, apesar do conhecimento da maioria dos inqueridos sobre a existência da doença.

Tabela 4. Frequência absoluta e relativa sobre a questão 1. Antes deste inquérito já tinha ouvido falar em Leptospirose?

	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
Não	3	37,5
Sim	5	62,5
Total	8	100

Tabela 5. Frequência absoluta e relativa sobre a questão 2. Sabia que esta doença pode afetar pessoas?

	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
Não	7	87,5
Sim	1	12,5
Total	8	100

3.1.2 Sinais Clínicos

Em relação à presença de sinais clínicos típicos de leptospirose nas explorações, foram realizadas duas questões: uma relativamente à ocorrência de abortos e a outra no que diz respeito à presença de casos de cegueira. Dos oito inquéritos realizados, 100% apresentaram uma resposta negativa referente à primeira pergunta, porém, três inqueridos responderam afirmativamente à segunda questão.

Tabela 6. Frequência absoluta e relativa sobre a questão 6. Existe algum caso de cegueira na exploração?

	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
Não	5	62,5
Sim	3	37,5
Total	8	100

Relativamente a casos de uveíte recorrente, foram relatados casos em 4 (11,8%) cavalos dos trinta e quatro presentes neste estudo. Desses quatro, 25% (1/4) apresentavam uveíte recorrente no olho direito, outros 25% (1/4) no olho esquerdo e 50% em ambos os olhos (2/5).

3.1.3 Vacinação

Em relação à realização de vacinação contra *Leptospira spp.*, nenhum dos trinta e quatro cavalos foi vacinado assim como qualquer cavalo alojado nas explorações visitadas.

3.1.4 Tipo de alojamento

No que se refere ao tipo de alojamento, mais de metade dos cavalos utilizados para este estudo encontravam-se em paddock.

Tabela 7. Frequência absoluta e relativa sobre a questão 8. Onde é que o cavalo se encontra alojado?

	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
Boxe	16	47,1
Paddock	18	52,9
Total	34	100

3.1.5 Fatores de risco

De acordo aos fatores de risco responsáveis pela transmissão e propagação da leptospirose equina, seis questões foram realizadas.

Tabela 8. Frequência absoluta e relativa sobre os fatores de risco associados à transmissão e propagação da leptospirose equina

		Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
Acesso a águas paradas (charcos, lagos)	Não	30	88,2
	Sim	4	11,8
Tipo de bebedouro	Bebedouro automático	19	55,9
	Balde	15	44,1
Local onde o alimento se encontra armazenado	Local exposto	16	47,1
	Local fechado	18	52,9
Contacto com roedores/animais selvagens	Não	0	0
	Sim	34	100
Controlo de pragas	Não	4	11,8
	Sim	30	88,2

3.1.6 Deteção da *Leptospira spp.*

Das trinta e quatro amostras de sangue colhidas, 100% apresentaram um resultado negativo utilizando a técnica de q-PCR. Ou seja, a *Leptospira spp.* não foi detetada em nenhuma das amostras.

4. Discussão

Em relação ao conhecimento sobre a leptospirose, mais de metade dos inqueridos sabiam sobre a existência da mesma. Desses respondentes, todos eram proprietários da exploração ou do picadeiro contribuindo, juntamente com os médicos veterinários, para um maior controlo a nível da propagação e da transmissão da doença.

Contudo, apenas uma pequena minioria dos inquiridos apresentou uma resposta afirmativa à cerca do conhecimento sobre a leptospirose ser uma zoonose. Segundo Alder & Moctezuma, 2010, a leptospirose é um problema global a nível da saúde pública. É identificada pela Organização Mundial da Saúde como sendo responsável por um milhão de casos clínicos e mais de 50.000 mortes por ano (Rajeev, 2022). As manifestações clínicas agudas são graves e incluem sintomas como febre, ictéria e insuficiência renal (O'Toole et al., 2015). Assim sendo, é importante alertar os tutores e os tratadores dos possíveis riscos associados. Em caso de suspeita de leptospirose, segundo Floey e Strabu, 2017, até o cavalo apresentar um PCR à urina negativo, o mesmo deve ser manuseado com cuidado utilizando luvas e protegendo as membranas mucosas. Assim como, áreas contaminadas, com urina ou tecidos de animais infetados, devem ser limpas com detergente e desinfetadas com produtos químicos como iodóforos (Heins, 2007).

Tendo em conta os fatores de risco associados, neste estudo, apenas uma pequena percentagem dos cavalos estudados, sendo importante salientar que todos se localizavam no mesmo centro hípico, tiveram acesso a fontes de água parada, como lagos e lagoas. Porém, o contacto destes equinos com águas estagnadas ocorreu apenas durante situações de lazer como passeios, existindo um controlo relativamente ao consumo das mesmas por parte do cavaleiro. De acordo com as características do agente etiológico, a relação entra a humidade da superfície do solo e a água é responsável pela persistência da bactéria no meio ambiente. A mesma pode sobreviver cento e oitenta e três dias em solos saturados de água (Levett, 2001). O facto da maioria dos cavalos analisados não terem sido sujeitos às condições supracitadas contribui para os resultados obtidos.

Embora a leptospirose seja mais comum em países com clima quente (Mcvey, Keenedy, Chengappa & Wilkes, 2022), como Portugal, em cavalos a infeção aguda da doença ocorre sobretudo durante as estações chuvosas, como a primavera e o outono (Gilger, Hollingsworth, 2017). Contudo, apesar das amostras terem sido coletadas entre os meses de março e maio, Portugal verificou uma seca moderada na região da Grande Lisboa e Santarém durante esse período. No entanto importa também referir que a leptospira sobrevive somente durante trinta minutos em solos secos (Levett, 2001).

A fonte hídrica utilizada para fornecimento aos cavalos era canalizada e devidamente tratada em todas as explorações e picadeiros visitadas neste estudo. Em relação ao tipo de bebedouro utilizado, a maior parte dos equinos consumia água através de bebedouros automáticos. Este pode ser um fator importante a considerar, pois a leptospira sobrevive um maior período de tempo em águas paradas do que com corrente (Radostits et al., 2002). Ao utilizar bebedouros automáticos, a água está em constante mudança e conseqüentemente mais limpa, ao contrário dos baldes que normalmente são mudados apenas uma vez por dia, apresentando um maior risco para a propagação da doença. Assim sendo, para prevenir e controlar a disseminação da leptospirose, o saneamento e a higiene da água são elementos cruciais (Wynwood et al., 2014). Apesar de quinze cavalos sujeitos ao estudo beberem água através de baldes, este fator de risco isolado não causou a contração da doença.

De acordo com os resultados obtidos, todos os cavalos utilizados neste estudo tinham contacto com roedores. Estes são considerados o principal reservatório de leptospirose (Levett, 2001; Meites et al., 2004; Tilahun, Reta & Simenew, 2013), excretando as bactérias através da urina e contaminando o meio ambiente durante dias, meses ou até mesmo anos (Radostits et al., 2006; Heins, 2007; Foley & Straub, 2017). A principal forma de infeção de leptospira em cavalos é o consumo de água contaminada com urina de animais portadores, especialmente do *Rattus spp.*, e através do contacto com estes animais (Radostits et al., 2007; Adler & Moctezuma, 2010). Assim sendo, a restrição à exposição de animais portadores da doença é considerada um meio de controlo para a prevenção da propagação da leptospirose (Heins, 2007; Dhanze, Kumar, Suman & Mane, 2013). Para este propósito foi reportado o controlo de roedores, através de ratoeiras ou pastilhas raticidas, utilizado em sete das oito explorações visitadas, existindo um cuidado a nível da substituição destes métodos num período de seis em seis meses pelos proprietários.

Dos trinta e quatro cavalos, uma parte significativa consumia feno e ração armazenados em locais fechados, sem acesso a roedores e outros animais domésticos. Segundo Meites et al., 2004, estes são um dos principais reservatórios da leptospirose, bem como os animais silvestres. Ainda, é importante que os proprietários sejam alertados sobre os riscos associados ao não armazenamento dos alimentos em locais adequadamente protegidos, já que os mesmos estarão acessíveis a animais infetados ou portadores da doença. Segundo Radostits et al., 2007, um animal infetado pode causar infeção contaminando a água, o pasto e os alimentos através da urina, de secreções uterinas e fetos abortados.

No que diz respeito ao tipo de alojamento, cavalos em boxe, alojados e tratados individualmente apresentam uma seropositividade inferior do que cavalos mantidos em grupo, nomeadamente em paddock ou em pastagem (Lees & Gale, 1994). Neste estudo, apesar de

mais de metade da amostra encontrar-se alojada em paddock, a utilização de vedações, limitando o acesso a áreas com águas paradas, como lagoas, e a colocação de pequenos grupos de cavalos por paddock, diminuíram a probabilidade de infeção dos cavalos. A restante parte da amostra estavam alocados em boxes, o que diminui de forma ainda mais eficaz a contração da doença.

Assim, verificou-se que a presença dos fatores de risco, mencionados anteriormente, é essencial para a contração da doença por parte dos animais e respetiva propagação. Assim, neste estudo, foi possível averiguar através do inquérito realizado, que a exposição dos cavalos utilizados a esses fatores foi significativamente baixa, justificando assim a não deteção de *Leptospira spp.* nas amostras.

Relativamente à presença de sinais clínicos, foram relatados casos de uveíte recorrente numa pequena percentagem dos animais estudados. A leptospirose é geralmente considerada como causa subjacente, porém a doença pode ser descrita como sendo imunomediada (Brandes et al., 2007). Seria importante realizar um exame oftalmológico completo e detalhado (Dearo, Souza, 2000), assim como reunir juntamente com o tutor um histórico completo de qualquer caso anterior de inflamação ou presença de sinais clínicos típicos de URE (Gilger, 2017). Apesar do resultado ter sido negativo à presença de *Leptospira spp.* no sangue, a realização posterior da técnica de PCR em tempo real em amostras como o humor vítreo ou aquoso juntamente com a produção intraocular de anticorpos, seriam os meios de diagnóstico favoráveis para determinar se a URE nestes casos está ou não associada à presença de *Leptospira spp.* (De Groot-Mijnes et al., 2006).

Outro possível quadro clínico associado à leptospirose equina é a ocorrência de abortos (Hamond, Pinna, Martins & Lilenbaum, 2013; DiAzevedo & Lilenbaum, 2022). Neste estudo, nenhuma das explorações visitadas apresentava histórico relativamente à presença desta patologia. Para além de abortos, a existência da leptospira no hospedeiro pode resultar em nadomortos e poldros fracos à nascença (Hamond, Pinna, Martins & Lilenbaum, 2013), assim como falhas reprodutivas por parte de éguas recetoras em todas as fases de gestação (Pinna, Martins, Souza & Lilenbaum, 2014; Pinna, Martins & Lilenbaum, 2012). Pode ainda causar infeção dos órgãos reprodutivos (Whitwell et al., 2009; Timoney et al., 2011; Verma, Stevenson & Adler, 2013). Assim, em caso de suspeita de presença do agente etiológico, é importante a realização de métodos sorológicos antes do período de cobrição ou programas de transferência de embriões (Pinna, Martins, Souza & Lilenbaum, 2014; Pinna, Martins & Lilenbaum, 2012). O facto da incidência de abortos nas explorações ser nula pode ser um fator indicativo da inexistência de leptospirose.

No que respeita à imunização contra a leptospirose, nenhum dos cavalos avaliados no presente trabalho se encontrava vacinado contra *Leptospira spp.* Na Europa, não existe

nenhuma vacina disponível (Malalana, 2020) e, portanto, a prática da vacinação contra a leptospirose não é prática usual em Portugal. Contudo, apesar de não ter sido detetado o agente patológico em nenhuma das trinta e quatro amostras, a realização de programas de vacinação é considerada uma medida de prevenção da propagação e transmissão da leptospirose (Radostits, Gay, Hinchcliff & Constable, 2006).

A utilização única do PCR quantitativo como técnica laboratorial poderá ser considerada uma limitação deste trabalho. Este método deve ser realizado no sangue durante a primeira semana de infeção, de acordo com a fisiopatologia da leptospirose, visto que a fase clínica aguda da doença ocorre neste período (Adler & Moctezuma, 2010; Schuller et al., 2015; Gilger & Hollingsworth, 2017). Após a leptospirémia, as bactérias são eliminadas rapidamente da circulação sanguínea e alojam-se nos rins (Adler e Moctezuma, 2010). Inicia-se simultaneamente a esta fase o desenvolvimento de anticorpos específicos no organismo (Schuller et al., 2015).

Métodos sorológicos como o ensaio de imunoabsorção enzimática e o teste de aglutinação microscópica identificam anticorpos produzidos pelos hospedeiros em resposta a infeções bacterianas (Barcellos, Marques, Mores, Centenaro & Sobestiansky, 2009). No caso da leptospirose, as imunoglobulinas específicas, nomeadamente as IgM e as IgG, são detetadas quatro a oito dias após o início da infeção (Flannery et al., 2001; Gilger & Hollingsworth, 2017). A técnica de ELISA, ao contrário do MAT, inclui ainda a capacidade de distinguir uma infeção aguda de uma crónica (Flannery et al., 2001). Assim, sendo que em casos crónicos a resposta por parte dos anticorpos é mínima, esta técnica de diagnóstico acaba por ser bastante útil na deteção da doença em animais portadores da mesma (Radostits, Gay, Hinchcliff & Constable, 2006). Porém, apesar desta limitação e de possíveis resultados falso-positivos e falso-negativos, o MAT é considerado o meio de diagnóstico “gold-standard” para a leptospirose, sobretudo em casos de infeção aguda em hospedeiros acidentais (Heins, 2014). No entanto, esta técnica é difícil de implementar por serem necessárias culturas vivas de diferentes serovares circulantes de *Leptospira spp.* Para além de se revelar bastante dispendioso, a leptospirose é considerada uma doença zoonótica e, por essa razão, a nível de segurança é necessário pessoal bem equipado e especializado capaz de interpretar corretamente os resultados (Yadeta, Michael & Abdela, 2016; Baburaj, Nandkumar & Khanna, 2006). Deste modo, um resultado negativo não descarta a presença do agente patológico no organismo, pois a leptospiremia é transitória (Schuller et al., 2015).

Outra limitação considerada nesta investigação foi a utilização de apenas de um tipo de material biológico, o sangue. A probabilidade de deteção da bactéria na urina seria maior, visto que após o período de leptospiremia, as bactérias alojam-se e reproduzem-se nos rins, podendo ser excretadas para o meio ambiente, durante dias, meses ou até anos (Langston &

Heuter, 2003; Skyes, Hartmann, Lunn, Moore, Stoddard & Goldstein, 2010). Assim sendo, cavalos clinicamente saudáveis podem ser portadores crónicos da doença (Hamond, Martins, Lawson-Ferreira, Medeiros & Lilenbaum, 2013).

Contudo, apesar do meio de diagnóstico utilizado assim como a amostra não serem os mais sensíveis para a deteção de *Leptospira spp.* em cavalos clinicamente saudáveis, a presença de resultados negativos, neste estudo, poderá ser justificada devido aos equinos utilizados não terem tido contacto com o agente etiológico devido aos cuidados de manejo dos proprietários e tratadores.

5. Conclusão

Através da realização deste estudo, foi possível concluir que o acesso limitado a áreas com águas paradas, o uso de ratoeiras e produtos químicos para o controlo de roedores e o armazenamento do alimento em locais fechados, eram medidas já implementadas na maioria das explorações visitadas visando assim, a diminuição da probabilidade de contração de leptospirose por parte dos cavalos e os respetivos resultados negativos em todas as amostras colhidas. Quanto à existência de diferenças na deteção e quantificação de espécies de *Leptospira* em cavalos estabulados e em extensivo, não foi possível verificar devido aos resultados negativos em todas as amostras colhidas.

Em relação ao conhecimento sobre a doença ser zoonótica, o mesmo foi quase nulo por parte dos inquiridos. Assim, é importante alertar os proprietários, tutores e tratadores dos possíveis riscos associados para a saúde e das diversas precauções a manusear um animal infetado com a doença.

Bibliografia

- Adler, B. (2015). History of leptospirosis and leptospira. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 387. Doi: 10.1007/978-3-662-45059-8_1.
- Adler Editor Leptospira, B. (2010). *Current Topics in Microbiology and Immunology*.
- Ahmed SA, Sandai DA, Musa S, Hoe CH, Riadzi M, Lau KL, Tang TH (2012). Rapid diagnosis of leptospirosis by multiplex PCR. *Malays J Med Sci*. 2012 Jul;19(3):9-16. PMID: 23610544; PMCID: PMC3629659.
- Alexander AD, Lessel E F, Evans L B, Franck E, Green S S. (1972). Preservation of leptospiras by liquid-nitrogen refrigeration. *Int J Syst Bacteriol*. 1972;22:165–169.
- Allbaugh, R. A. (2017). Equine recurrent uveitis: A review of clinical assessment and management. In *Equine Veterinary Education* (Vol. 29, Issue 5, pp. 279–288). Equine Veterinary Journal Ltd. Doi: 10.1111/eve.12548.
- Annear, D. I. (1974). International Association of Microbiological Societies. In *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY* (Vol. 24, Issue 4).
- Arent, Z., Pardyak, L., Dubniewicz, K., Płachno, B. J., & Kotula-Balak, M. (2022). *Leptospira* taxonomy: then and now. In *Medycyna Weterynaryjna* (Vol. 78, Issue 10, pp. 489–496). Polskie Towarzystwo Nauk Weterynaryjnych. Doi: 10.21521/mw.6694.
- Barwick RS, Mohammed HO, McDonough PL, White ME. (1997). Risk factors associated with the likelihood of leptospiral seropositivity in horses in the state of New York. *Am J Vet Res*. 1997 Oct;58(10):1097-103. PMID: 9328661.
- Baverud, V., Gunnarsson, A., Engvall, E. O., Franzén, P., & Egenvall, A. (2009). *Leptospira* seroprevalence and associations between seropositivity, clinical disease and host factors in horses. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 51(1). Doi: 10.1186/1751-0147-51-15.

- Benacer, D., Who, P. Y., Zain, S. N. M., Amran, F., & Thong, K. L. (2013). Pathogenic and saprophytic *Leptospira* species in water and soils from selected urban sites in peninsular Malaysia. *Microbes and Environments*, 28(1), 135–140.
Doi:10.1264/jsme2.ME12154
- Bernard, W. V. (1993). Leptospirosis. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, 9(2), 435–444. Doi: 10.1016/S0749-0739(17)30410-8.
- Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E, Vinetz JM. (2003). Peru-United States Leptospirosis Consortium. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis*. 2003 Dec;3(12):757-71. Doi: 10.1016/s1473-3099(03)00830-2.
- Bierque, E., Thibeaux, R., Girault, D., Soupé-Gilbert, M. E., & Goarant, C. (2020). A systematic review of *Leptospira* in water and soil environments. *PLoS ONE*, 15(1). Doi: 10.1371/journal.pone.0227055.
- Borstel, M., Oey, L., Strutzberg-Minder, K., Boevé, M.H (2010). Direct and indirect detection of leptospires in vitreal samples of horses with ERU. Doi: 10.21836/PEM20100217
- Brandes, K., Wollanke, B., Niedermaier, G., Brem, S., & Gerhards, H. (2007). Recurrent Uveitis in Horses: Vitreal Examinations with Ultrastructural Detection of Leptospires.
- Branger, C., Blanchard, B., Fillonneau, C., Suard, I., Aviat, F., Chevallier, B., & André-Fontaine, G. (2005). Polymerase chain reaction assay specific for pathogenic *Leptospira* based on the gene hap1 encoding the hemolysis-associated protein-1. *FEMS Microbiology Letters*, 243(2), 437–445.
Doi: 10.1016/j.femsle.2005.01.007
- Brenner, D. J., Kaufmann, A. F., Sulzer, K. R., Steigerwalt, A. G., Rogers, F. C., & Weyant, R. 5. (1999). Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. In *International Journal of Systematic Bacteriology* (Vol. 49).

- Broux, B., Torfs, S., Wegge, B., Deprez, P., & van Loon, G. (2012). Acute Respiratory Failure Caused by *Leptospira* spp. in 5 Foals. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 26(3), 684–687. Doi: 10.1111/j.1939-1676.2012.00902.x
- Casanovas-Massana, A., Hamond, C., Santos, L. A., de Oliveira, D., Hacker, K. P., Balassiano, I., Costa, F., Medeiros, M. A., Reis, M. G., Ko, A. I., & Wunder, E. A. (2020). *Leptospira yasudae* sp. Nov. and *Leptospira stimsonii* sp. nov., two new species of the pathogenic group isolated from environmental sources. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(3), 1450–1456. Doi: 10.1099/ijsem.0.003480
- Cerqueira, G. M., McBride, A. J. A., Picardeau, M., Ribeiro, S. G., Moreira, Â. N., Morel, V., Reis, M. G., Ko, A. I., & Dellagostin, O. A. (2009). Distribution of the leptospiral immunoglobulin-like (lig) genes in pathogenic *Leptospira* species and application of ligB to typing leptospiral isolates. *Journal of Medical Microbiology*, 58(9), 1173–1181. Doi: 10.1099/jmm.0.009175-0
- Cerqueira, G. M., & Picardeau, M. (2009). A century of *Leptospira* strain typing. In *Infection, Genetics and Evolution* (Vol. 9, Issue 5, pp. 760–768). Doi: 10.1016/j.meegid.2009.06.009
- Chaiwattananrungruengpaisan, S., Suwanpakdee, S., Sangkachai, N., Chamsai, T., Taruyanon, K., & Thongdee, M. (2018). Potentially Pathogenic *Leptospira* Species Isolated from a Waterfall in Thailand. In *Jpn. J. Infect. Dis* (Vol. 71).
- Chirathaworn, C., Inwattana, R., Poovorawan, Y., & Suwancharoen, D. (2014). Interpretation of microscopic agglutination test for leptospirosis diagnosis and seroprevalence. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4, S162–S164. Doi: 10.12980/APJTB.4.2014C580
- Croda, J., Ramos, J. G. R., Matsunaga, J., Queiroz, A., Homma, A., Riley, L. W., Haake, D. A., Reis, M. G., & Ko, A. I. (2007). *Leptospira* immunoglobulin-like proteins as a serodiagnostic marker for acute leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(5), 1528–1534. Doi: 10.1128/JCM.02344-06

- Cullen, P. A., Haake, D. A., & Adler, B. (2004). Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 28, Issue 3, pp. 291–318).
Doi: 10.1016/j.femsre.2003.10.004
- De Groot-Mijnes, J. D. F., Rothova, A., Van Loon, A. M., Schuller, M., Ten Dam-Van Loon, N. H., De Boer, J. H., Schuurman, R., & Weersink, A. J. L. (2006). Polymerase chain reaction and goldmann-witmer coefficient analysis are complimentary for the diagnosis of infectious uveitis. *American Journal of Ophthalmology*, 141(2), 313–318.
Doi: 10.1016/j.ajo.2005.09.017
- Deeg, C. A., Ehrenhofer, M., Thurau, S. R., Reese, S., Wildner, G., & Kaspers, B. (2002). Immunopathology of recurrent uveitis in spontaneously diseased horses. *Experimental Eye Research*, 75(2), 127–133.
Doi: 10.1006/exer.2002.2011
- Deeg, C. A., Kaspers, B., Gerhards, H., Thurau, S. R., Wollanke, B., & Wildner, G. (2001). Immune Responses to Retinal Autoantigens and Peptides in Equine Recurrent Uveitis.
- Deeg, C. A., Pompetzki, D., Raith, A. J., Hauck, S. M., Amann, B., Suppmann, S., Goebel, T. W. F., Olazabal, U., Gerhards, H., Reese, S., Stangassinger, M., Kaspers, B., & Ueffing, M. (2006). Identification and functional validation of novel autoantigens in equine uveitis. *Molecular and Cellular Proteomics*, 5(8), 1462–1470. Doi: 10.1074/mcp.M500352-MCP200.
- De Groot-Mijnes JD, Rothova A, Van Loon AM, Schuller M, Ten Dam-Van Loon NH, De Boer JH, Schuurman R, Weersink AJ. (2006). Polymerase chain reaction and Goldmann-Witmer coefficient analysis are complimentary for the diagnosis of infectious uveitis. *Am J Ophthalmol*. 2006 Feb;141(2):313-8. doi: 10.1016/j.ajo.2005.09.017.
- Dey, S., Mohan, C. M., Kumar, T. M. A. S., Ramadass, P., Nainar, A. M., & Nachimuthu, K. (2004). Recombinant LipL32 antigen-based single serum dilution ELISA for detection of canine leptospirosis. *Veterinary Microbiology*, 103(1–2), 99–106. Doi: 10.1016/j.vetmic.2004.07.018
- Dhanze, H., Kumar, M., Mane., B. (2013). Epidemiology if leptospirosis: na Indian perspective.

- Di Azevedo, M. I. N., & Lilenbaum, W. (2022). Equine genital leptospirosis: Evidence of an important silent chronic reproductive syndrome. In *Theriogenology* (Vol. 192, pp. 81–88). Elsevier Inc. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2022.08.029.
- Dierks, J., Servies, T., & Do, T. (2018). A Study on the Leptospirosis Outbreak among US Marine Trainees in Okinawa, Japan. *Military Medicine*, 183(3–4), E208–E212. Doi: 10.1093/milmed/usx013.
- Dirienzo, J. M., Nakamura, K., & Inouye, M. (1978). The Outer Membrane Proteins Of Gram-Negative Bacteria: Biosynthesis, Assembly And Functions. In *Annu Rev Biochem.* 1978;47:481-532. Doi: 10.1146/annurev.bi.47.070178.002405.
- Divers, T. J., Chang, Y. F., Irby, N. L., Smith, J. L., & Carter, C. N. (2019). Leptospirosis: An important infectious disease in North American horses. In *Equine Veterinary Journal* (Vol. 51, Issue 3, pp. 287–292). Equine Veterinary Journal Ltd. <https://doi.org/10.1111/evj.13069>.
- Dos Santos LF, Guimarães MF, de Souza GO, da Silva IWG, Santos JR, Azevedo SS, Labruna MB, Heinemann MB, Horta MC. (2017). Seroepidemiological survey on *Leptospira spp.* infection in wild and domestic mammals in two distinct areas of the semi-arid region of northeastern Brazil. *Trop Anim Health Prod.* 2017 Dec;49(8):1715-1722. Doi: 10.1007/s11250-017-1382-9
- Dubielzig, R.R; Render, J.A; Morreale, R.J. (1997). Distinctive morphologic features of the ciliary body in equine recurrent uveitis. *Veterinary and Comparative Ophtalmology* 7(3): 163-167.
- Dupont, H., Dupont-Perdrizet, D., Luc, J., Zehner-Hansen, S., Jarrige, B., & Daijardin, J. B. (1997). Leptospirosis: Prognostic Factors Associated with Mortality. *Clin Infect Dis.* 25(3): 720-4 Doi: 10.1086/513767.
- Dupouey, J., Faucher, B., Edouard, S., Richet, H., Kodjo, A., Drancourt, M., & Davoust, B. (2014). Human leptospirosis: An emerging risk in Europe? In *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* (Vol. 37, Issue 2, pp. 77–83). Doi: 10.1016/j.cimid.2013.12.002.

- Dwyer, A.E., Crockett, R.S. and Kalsow, C.M. (1995) Association of leptospiral seroreactivity and breed with uveitis and blindness in horses: 372 cases (1986-1993). *J. Am. vet. med. Ass.* 207, 1327-1331.
- Ebani, V. V, Bertelloni, F., Pinzauti, P., Cerri, D., & Seroprevalence, C. D. (2012). 237-240 of *Leptospira spp.* and *Borrelia burgdorferi sensu lato* in Italian horses. In *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* (Vol. 19, Issue 2).
- Ellinghausen HC Jr, Mccullough WG (1965). Nutrition Of *Leptospira Pomona* And Growth of 13 Other Serotypes: Fractionation Of Oleic Albumin Complex And A Medium Of Bovine Albumin And Polysorbate 80. *Am J Vet Res.*
- Ellis, W. A., O'Brien, J. J., Cassells, J. A., & MONTGOMERY, J. (1983). Leptospiral infection in horses in Northern Ireland: Serological and microbiological findings. *Equine Veterinary Journal*, 15(4), 317–320. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1983.tb01809.x>
- Erol, E., Jackson, C. B., Steinman, M., Meares, K., Donahoe, J., Kelly, N., Locke, S., Smith, J. L., & Carter, C. N. (2015). A diagnostic evaluation of real-time PCR, fluorescent antibody and microscopic agglutination tests in cases of equine leptospiral abortion. *Equine Veterinary Journal*, 47(2), 171–174. Doi: <https://doi.org/10.1111/evj.12281>.
- Estavoyer, J.M., Racadot, E., Couetdic, G., Leroy, J. & Grosperin, L. (1991). Tumor necrosis factor in patients with leptospirosis. *Rev Infect Dis* 13:1245, 1991.
Doi: 10.1093/clinids/13.6.1245
- Faine, S., Adler, B., Bolin, C. and Perolat, P. (1999) *Leptospira and Leptospirosis*. 2nd Edition, Medisci Press, Melbourne.
- Fernandes, L. G. V., Vieira, M. L., Kirchgatter, K., Alves, I. J., de Moraes, Z. M., Vasconcellos, S. A., Romero, E. C., & Nascimento, A. L. T. O. (2012). Omp1 is an extracellular matrix- and plasminogen-interacting protein of *Leptospira spp.* *Infection and Immunity*, 80(10), 3679–3692. <https://doi.org/10.1128/IAI.00474-12>.

- Fischer, B. M., Brehm, W., Reese, S., & McMullen, R. J. (2023). Equine recurrent uveitis—A review. In *Equine Veterinary Education* (Vol. 35, Issue 5, pp. 254–264). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/eve.13695>.
- Flannery, B., Costa, D., Carvalho, F. P., Guerreiro, H., Matsunaga, J., Da Silva, E. D., ... & Ko, A. I. (2001). Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. *Journal of clinical microbiology*, 39(9), 3303-3310.
- Foote, A. K., Ricketts, S. W., & Whitwell, K. E. (2012). A racing start in life? The hurdles of equine feto-placental pathology. In *Equine Veterinary Journal* (Vol. 44, Issue SUPPL. 41, pp. 120–129). Equine Veterinary Journal Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2011.00507.x>
- Fraga TR, Barbosa AS, Isaac L. (2011). Leptospirosis: aspects of innate immunity, immunopathogenesis and immune evasion from the complement system. *Scand J Immunol.* 2011 May;73(5):408-19. doi: 10.1111/j.1365-3083.2010.02505.x.
- Frellstedt, L. (2009a). Equine recurrent uveitis: A clinical manifestation of leptospirosis. *Equine Veterinary Education*, 21(10), 546–552. Doi: 10.2746/095777309X467853
- Frellstedt, L. (2009b). Equine recurrent uveitis: A clinical manifestation of leptospirosis. *Equine Veterinary Education*, 21(10), 546–552. Doi: 10.2746/095777309X467853
- Gerding, J. C., & Gilger, B. C. (2015). Prognosis and impact of equine recurrent uveitis. *Equine Veterinary Journal*, 48(3), 290–298. Doi: 10.1111/evj.12451
- Gerding, J. C., & Gilger, B. C. (2016). Prognosis and impact of equine recurrent uveitis. *Equine Veterinary Journal*, 48(3), 290–298. Doi: 10.1111/evj.12451
- Gilger, B. C., Malok, E., Cutter, K. V, Stewart, T., Horohov, D. W., & Allen, J. B. (1999). Characterization of T-lymphocytes in the anterior uvea of eyes with chronic equine recurrent uveitis. *Vet Immunol Immunopathol.* Doi: 10.1016/s0165-2427(99)00082-3.

- Gilger, B. C., & Michau, T. M. (2004). Equine recurrent uveitis: New methods of management. In *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice* (Vol. 20, Issue 2, pp. 417–427). Doi: 10.1016/j.cveq.2004.04.010.
- Guerrant, R.L, Walker, D.H, Weller, P.F (2006); *Tropical Infectious Diseases*. 6th Edition, Elsevier Churchill-Livingstone, Philadelphia, 159.
- Guglielmini J, Bourhy P, Schiettekatte O, Zinini F, Brisse S, Picardeau M. (2019). Genus-wide *Leptospira* core genome multilocus sequence typing for strain taxonomy and global surveillance. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019 Apr 26;13(4):e0007374. Doi: 10.1371/journal.pntd.0007374.
- Goldstein SF, Charon NW. (1990). Multiple-exposure photographic analysis of a motile spirochete. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Jul;87(13):4895-9. Doi: 10.1073/pnas.87.13.4895.
- Gollop, J. H., Katz, A. R., Rudoy, R. C., & Sasaki, D. M. (1993). Rat-bite leptospirosis. *Western journal of medicine*, 159(1), 76.
- Greenen, C. E. (2012). *Infectious diseases of the dog and cat* (4th ed.). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.
- Haake, D. A., Chao, G., Zuerner, R. L., Barnett, J. K., Barnett, D., Mazel, M., Matsunaga, J., Levett, P. N., & Bolin, C. A. (2000). The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infection and Immunity*, 68(4), 2276–2285. Doi: 10.1128/IAI.68.4.2276-2285.2000
- Haake, D. A., & Zuckert, W. R. (2014). The leptospiral outer membrane. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 387, 187–221. Doi: 10.1007/978-3-662-45059-8_8
- Haake, D. A. (2000). Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. In *Microbiology* (Vol. 146).
- Hamond, C., Martins, G., Lawson-Ferreira, R., Medeiros, M. A., & Lilenbaum, W. (2013). The role of horses in the transmission of leptospirosis in an urban tropical area. *Epidemiology and Infection*, 141(1), 33–35. Doi: 10.1017/S0950268812000416.

- Hamond, C., Pinna, A., Martins, G., & Lilenbaum, W. (2014). The role of leptospirosis in reproductive disorders in horses. In *Tropical Animal Health and Production* (Vol. 46, Issue 1, pp. 1–10). Kluwer Academic Publishers. Doi: 10.1007/s11250-013-0459-3org.
- Hartskeerl, R. A., Goris, M. G. A., Brem, S., Meyer, P., Kopp, H., Gerhards, H., & Wollanke, B. (2004). Classification of *Leptospira* from the Eyes of Horses Suffering from Recurrent Uveitis.
- Heins, M. (2014). Leptospirosis. In D. Sellon, *Equine Infectious Diseases*. Missouri.
- Hernández-Rodríguez, P., Díaz, C. A., Dalmau, E. A., & Quintero, G. M. (2011). A comparison between polymerase chain reaction (PCR) and traditional techniques for the diagnosis of leptospirosis in bovines. In *Journal of Microbiological Methods* (Vol. 84, Issue 1, pp. 1–7). Elsevier B.V. Doi: 10.1016/j.mimet.2010.10.021.
- Houwers, D. J., Goris, M. G. A., Abdoel, T., Kas, J. A., Knobbe, S. S., van Dongen, A. M., Westerduin, F. E., Klein, W. R., & Hartskeerl, R. A. (2011). Agglutinating antibodies against pathogenic *Leptospira* in healthy dogs and horses indicate common exposure and regular occurrence of subclinical infections. In *Veterinary Microbiology* (Vol. 148, Issues 2–4, pp. 449–451). Doi: 10.1016/j.vetmic.2010.08.020.
- Hsu, S.H, Yang, C.W. (2022). Insight into the Structure, Functions, and Dynamics of the *Leptospira* Outer Membrane Proteins with the Pathogenicity.
Doi: 10.3390/membranes12030300.
- Johnson RC, Harris VG. (1967). Differentiation of pathogenic and saprophytic letospires. I. Growth at low temperatures. *J Bacteriol.* 1967 Jul;94(1):27-31. doi: 10.1128/jb.94.1.27-31.1967.
- Khurana, S.K, Dhama, K., Minakshi, P., Gulati, B., Malik, Y. S., & Karthik, K. (2016). Leptospirosis in horses: special reference to equine recurrent uveitis. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 4.
- Kiston-Piggot A.W & Prescott, J.F. (1987). Leptospirosis infection in horses in Ontario. *Can J Vet Res* 51: 448, 1987.

- Ko, A. I., Goarant, C., & Picardeau, M. (2009). *Leptospira*: The dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 7, Issue 10, pp. 736–747). Doi: 10.1038/nrmicro2208.
- Koizumi, N., Nakajima, C., Harunari, T., Tanikawa, T., Tokiwa, T., Uchimura, E., Furuya, T., Mingala, C. N., Villanueva, M. A., Ohnishi, M., & Suzuki, Y. (2012). A new loop-mediated isothermal amplification method for rapid, simple, and sensitive detection of *Leptospira spp.* in urine. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(6), 2072–2074. Doi: 10.1128/JCM.00481-12.
- Koizumi, N., & Watanabe, H. (2004). Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. *Vaccine*, 22(11–12), 1545–1552. Doi: 10.1016/j.vaccine.2003.10.007.
- Korba AA, Lounici H, Kainiu M, Vincent AT, Mariet JF, Veyrier FJ, Goarant C, Picardeau M. (2021). *Leptospira ainlahdjerensis sp. nov.*, *Leptospira ainazelensis sp. nov.*, *Leptospira abararensis sp. nov.* and *Leptospira chreensis sp. nov.*, four new species isolated from water sources in Algeria. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2021 Dec;71(12). doi: 10.1099/ijsem.0.005148.
- Lambert, A., Picardeau, M., Haake, D. A., Sermiswan, R. W., Srikram, A., Adler, B., & Murray, G. A. (2012). Fla proteins in *Leptospira interrogans* are essential for motility and virulence but are not required for formation of the flagellum sheath. *Infection and Immunity*, 80(6), 2019–2025. Doi: 10.1128/IAI.00131-12.
- Langston, C. E., & Heuter, K. J. (2003). Leptospirosis. A re-emerging zoonotic disease. In *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice* (Vol. 33, Issue 4, pp. 791–807). W.B. Saunders. Doi: 10.1016/S0195-5616(03)00026-3.
- Launois, T., González Hilarión, L. M., Barbe, F., Leurquin, C., Bihin, B., Hontoir, F., Dugdale, A., & Vandeweerd, J. M. (2019). Use of Intravitreal Injection of Gentamicin in 71 Horses With Equine Recurrent Uveitis. *Journal of Equine Veterinary Science*, 77, 93–97. Doi: 10.1016/j.jevs.2019.02.018.

- Lees VW, Gales Gale SP. (1994) Titers to *Leptospira* species in horses in Alberta. *Can Vet J.* 1994 Oct;35(10):636-40. PMID: 7994706.
- Letocart M, Baranton G & Perolat P. (1997). Rapid identification of pathogenic *Leptospira* species (*Leptospira interrogans*, *L. borgpetersenii*, and *L. kirschneri*) with species-specific DNA probes produced by arbitrarily primed PCR. *J Clin Microbiol.* 1997 Jan;35(1):248-53. Doi: 10.1128/jcm.35.1.248-253.1997.
- Levett, P. N. (2001). Leptospirosis. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 14, Issue 2, pp. 296–326). Doi: 10.1128/CMR.14.2.296-326.2001.
- Levett P. N., Smythe L. (2008): International Committee on Systema.
- Lizer, J., Grahlmann, M., Hapke, H., Velineni, S., Lin, D., & Kohn, B. (2017). Evaluation of a rapid IgM detection test for diagnosis of acute leptospirosis in dogs. *Veterinary Record*, 180(21), 517. Doi: 10.1136/vr.104134.
- Maggs DJ, Lappin MR, Nasisse MP. (1999). Detection of feline herpesvirus-specific antibodies and DNA in aqueous humor from cats with or without uveitis. *Am J Vet Res.* 1999 Aug;60(8):932-6.
- Malalana, F. (2019). Leptospirosis in horses: A European perspective. In *Equine Veterinary Journal* (Vol. 51, Issue 3, pp. 285–286). Equine Veterinary Journal Ltd. Doi: 10.1111/evj.13022.
- Malalana, F. (2020). What's new in equine recurrent uveitis? *In Practice*, 42(6), 348–354. Doi:10.1136/inp.m2464.
- Malalana, F., Blundell, R. J., Pinchbeck, G. L., & McGowan, C. M. (2017). The role of *Leptospira* spp. in horses affected with recurrent uveitis in the UK. *Equine Veterinary Journal*, 49(6), 706–709. Doi: 10.1111/evj.12683
- Malalana, F., Stylianides, A., & McGowan, C. (2015). Equine recurrent uveitis: Human and equine perspectives. In *Veterinary Journal* (Vol. 206, Issue 1, pp. 22–29). Bailliere Tindall Ltd. Doi: 10.1016/j.tvjl.2015.06.017

- Masuzawa, T., Sakakibara, K., Saito, M., Hidaka, Y., Villanueva, S. Y. A. M., Yanagihara, Y., & Yoshida, S. I. (2018). Characterization of *Leptospira* species isolated from soil collected in Japan. In *Microbiology and Immunology* (Vol. 62, Issue 1, pp. 55–59). Blackwell Publishing Asia.
Doi: 10.1111/1348-0421.12551
- Matsunaga, J., Barocchi, M. A., Croda, J., Young, T. A., Sanchez, Y., Siqueira, I., Bolin, C. A., Reis, M. G., Riley, L. W., Haake, D. A., & Ko, A. I. (2003). Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. *Molecular Microbiology*, 49(4), 929–946. Doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03619.x
- McMullen, R. J., & Fischer, B. M. (2017). Medical and Surgical Management of Equine Recurrent Uveitis. In *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice* (Vol. 33, Issue 3, pp. 465–481). W.B. Saunders.
Doi: 10.1016/j.cveq.2017.07.003
- Mcvey, D. S., Kennedy, M., Chengappa, M. M., & Wilkes, R. (2022). *Veterinary Microbiology Fourth Edition*.
- Merien, F., Portnoi, D., Bourhy, P., Charavay, F., Berlioz-Arthaud, A., & Baranton, G. (2005). A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. *FEMS Microbiology Letters*, 249(1), 139–147.
Doi: 10.1016/j.femsle.2005.06.011
- Meites, E., Jay, MT., Deresinski, S., Shieh, WJ., Zaki, SR., Tompkins, L., Smith, D. (2004). *Emerg Infect Dis.* 10(3): 406–412. Doi: 10.3201/eid1003.030431.
- Midence, J. N., Leutenegger, C. M., Chandler, A. M., & Goldstein, R. E. (2012). Effects of recent *Leptospira* vaccination on whole blood real-time PCR testing in healthy client-owned dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 26(1), 149–152. Doi: 10.1111/j.1939-1676.2011.00852.x.
- Mohd Radi MF., Hashim JH., Jaafar MH., Hod R., Ahmad N., Mohammed Nawi A., Baloch GM., Ismail R., Farakhin Ayub NI. (2018). Leptospirosis Outbreak After the 2014 Major Flooding Event in Kelantan, Malaysia: A Spatial-Temporal Analysis. *Am J Trop Med Hyg.* 2018 May;98(5):1281-1295. Doi: 10.4269/ajtmh.16-0922.

- Morter RL., Herschler RC., Fessler JF., Lavignette A. (1964). Experimental equine leptospirosis (*Leptospira pomona*). Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc. 1964;68:147-52. PMID: 5217493.
- Nahori, M.-A., Fournié-Amazouz, E., Que-Gewirth, N. S., Balloy, V., Chignard, M., Raetz, C. R. H., Saint Girons, I., & Werts, C. (2005). Differential TLR Recognition of Leptospiral Lipid A and Lipopolysaccharide in Murine and Human Cells. *The Journal of Immunology*, 175(9), 6022–6031.
Doi: 10.4049/jimmunol.175.9.6022.
- Naiman, B. M., Alt, D., Bolin, C. A., Zuerner, R., & Baldwin, C. L. (2001). Protective killed *Leptospira borgpetersenii* vaccine induces potent Th1 immunity comprising responses by CD4 and $\gamma\delta$ T lymphocytes. *Infection and Immunity*, 69(12), 7550–7558.
Doi:10.1128/IAI.69.12.7550-7558.2001.
- Nervig RM., Garrett LA. (1979). Use of furosemide to obtain bovine urine samples for leptospiral isolation. *Am J Vet Res.* 1979 Aug;40(8):1197-1200. PMID: 525924.
- Niedermaier, G., Wollanke B, Hoffmann R, Brem S, Gerhards H. (2006). Darstellung von Leptospiren im Glaskörper augengesunder und an ERU erkrankter Pferde mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 2006 Nov;113(11):418-22. German. PMID: 17147152.
- Oliveira, J., Bortolanza, F., Passos, D., Pires-Neto, J., Fallavena, L., Weimer, T. (2007). Molecular diagnosis of *Leptospira spp.* in culled sows. Doi: 10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2007.26655.
- O'toole, S. M., Pathak, N., Toms, G. C., Gelding, S. V, & Sivaprakasam, V. (2015). Fever, jaundice and acute renal failure. In *Acute Medical Care Clinical Medicine* (Vol. 15, Issue 1).
- Ottemann, K. M., & Lowenthal, A. C. (2002). *Helicobacter pylori* uses motility for initial colonization and to attain robust infection. *Infection and Immunity*, 70(4), 1984–1990. Doi: 10.1128/IAI.70.4.1984-1990.2002.

- Paglia, D. T., Miller, P. E., & Dubielzig, R. R. (2004). James Wardrop and Equine Recurrent Uveitis. In *Arch Ophthalmol* (Vol. 122).
- Palaniappan, R. U. M., Chang, Y. F., Jusuf, S. S. D., Artiushin, S., Timoney, J. F., McDonough, S. P., Barr, S. C., Divers, T. J., Simpson, K. W., McDonough, P. L., & Mohammed, H. O. (2002). Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA protein of *Leptospira interrogans*. *Infection and Immunity*, 70(11), 5924–5930.
Doi: 10.1128/IAI.70.11.5924-5930.2002.
- Palmer, M. F., & Zochowski, W. J. (2000). Survival of leptospires in commercial blood culture systems revisited. *Journal of Clinical Pathology*, 53(9), 713–714.
Doi: 10.1136/jcp.53.9.713.
- Park, Y. G., Gordon, J. C., Bech-Nielsen, S., & Slemons, R. D. (1992). Factors for seropositivity to leptospirosis in horses. In *Preventive Veterinary Medicine* (Vol. 13).
- Parma, A. E., Cerone, S. I., & Sansinanea, S. A. (1992). *Leptospira* and equine ocular tissues. In *Veterinary Immunology and Immunopathology* (Vol. 33).
- Pellegrini-masini H Poppenga, A. R., Sweeney, R. W., & Pellegrini-Masini, A. (2004). Disposition of flunixin meglumine injectable preparation administered orally to healthy horses.
- Picardeau, M. (2013). Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. In *Medecine et Maladies Infectieuses* (Vol. 43, Issue 1, pp. 1–9).
Doi: 10.1016/j.medmal.2012.11.005.
- Picardeau, M. (2017). Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita?. *Nature Reviews Microbiology*, 15(5), 297-307. Doi: 10.1038/nrmicro.2017.5.
- Pikalo J, Sattler T, Eichinger M, Loitsch A, Sun H, Schmoll F, Schusser GF. (2016). Vorkommen von Antikörpern gegen Leptospiren bei Pferden im mitteldeutschen Raum. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2016 May-Jun;129(5-6):202-8. German. PMID: 27344912.

- Pinna, A. E., Martins, G., Hamond, C., Lilenbaum, W., & Medeiros, M. A. (2011). Molecular diagnostics of leptospirosis in horses is becoming increasingly important. In *Veterinary Microbiology* (Vol. 153, Issues 3–4, p. 413). Doi: 10.1016/j.vetmic.2011.06.015.
- Pinna, A., Martins, G., & Lilenbaum, W. (2012). Leptospirosis and embryo recovery rate in mares. In *Veterinary Record* (Vol. 170, Issue 2, p. 60).
Doi: 10.1136/vr.e296.
- Pinna, A., Martins, G., Souza, G., & Lilenbaum, W. (2013). Influence of seroreactivity to leptospira and reproductive failures in recipient mares of equine embryo transfer programmes. *Reproduction in Domestic Animals*, 48(4). Doi: 10.1111/rda.12166.
- Pinna, M., Martins, G., Freire, I., & Lilenbaum, W. (2010). Seropositivity to *Leptospira interrogans* serovar Bratislava associated to reproductive problems without significant biochemical or hematological alterations in horses. 10, 2214–2217.
- Plank, R., & Dean, D. (2000). Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira spp.* in humans. *Microbes Infect.* 2000 Aug;2(10):1265-76.
Doi: 10.1016/s1286-4579(00)01280-6.
- Polle, F., Storey, E.S., Eades, S.C., Alt, D.P., Hornsby, R.L., Zuerner, R.L., & Carter, R.T. (2014). Role of Intraocular *Leptospira* Infections in the Pathogenesis of Equine Recurrent Uveitis in the Southern United States. *Journal of Equine Veterinary Science*, 34, 1300-1306.
- Poonacha, K. B., Donahue, J. M., Giles, R. C., Hong, C. B., Petrites-Murphy, M. B., Smith, B. J., Swerczek, T. W., Tramontin, R. R., & Tuttle, P. A. (1993). Leptospirosis in equine fetuses, stillborn foals, and placentas. *Veterinary Pathology*, 30(4), 362–369.
Doi: 10.1177/030098589303000405.
- Quinn P.J., Markey B.K., Carter M.E., Donnelly W.J., Leonard F.C. (2002) *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Blackwell Science, Oxford.

- Radostits, O., Gay, C., Hinchcliff, K., Constable, P. (2006). *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, sheep, goats, pigs and horses.*
- Reagan, K. L., & Sykes, J. E. (2019). Diagnosis of Canine Leptospirosis. In *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice* (Vol. 49, Issue 4, pp. 719–731). W.B. Saunders. Doi: 10.1016/j.cvsm.2019.02.008.
- Regan, D. P., Aarnio, M. C., Davis, W. S., Carmichael, K. P., Vandenplas, M. L., Lauderdale, J. D., & Moore, P. A. (2012). Characterization of cytokines associated with Th17 cells in the eyes of horses with recurrent uveitis. *Veterinary Ophthalmology*, 15(3), 145–152. Doi: 10.1111/j.1463-5224.2011.00951.x.
- Robert-Gangneux F., Binisti P., Antonetti D., Brezin A., Yera H., Dupouy-Camet J. (2004). Usefulness of immunoblotting and Goldmann-Witmer coefficient for biological diagnosis of toxoplasmic retinochoroiditis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2004 Jan;23(1):34-8. Doi: 10.1007/s10096-003-1048-6.
- Rocha, T., Ellis, W. A., Montgomery, J., Gilmore, C., Regalla, J., & Brem, S. (2004). Microbiological and serological study of leptospirosis in horses at slaughter: First isolations. *Research in Veterinary Science*, 76(3), 199–202. Doi: 10.1016/j.rvsc.2003.12.003.
- Romeike A., Brüggmann M, Drommer W. (1998). Immunohistochemical studies in equine recurrent uveitis (ERU). *Vet Pathol.* 1998 Nov;35(6):515-26. Doi: 10.1177/030098589803500606. PMID: 9823593.
- Rosa, M. I., dos Reis, M. F., Simon, C., Dondossola, E., Alexandre, M. C., Colonetti, T., & Meller, F. O. (2017). ELISA IgM para diagnóstico de leptospirose: Revisão sistemática e meta-análise. In *Ciencia e Saude Coletiva* (Vol. 22, Issue 12, pp. 4001–4012). Associacao Brasileira de Pos - Graduacao em Saude Coletiva. Doi: 10.1590/1413 812320172212.14112016.
- Samrot, A. V., Sean, T. C., Bhavya, K. S., Sahithya, C. S., Chandrasekaran, S., Palanisamy, R., Robinson, E. R., Subbiah, S. K., & Mok, P. L. (2021). Leptospiral infection, pathogenesis and its diagnosis—a review. In *Pathogens* (Vol. 10, Issue 2, pp. 1–30). MDPI AG.

Doi: 10.3390/pathogens10020145

- Santos, D. E., Barcellos, N., Ferreira, B. M., Prado Marques, P., Mores, T. J., Centenaro, F., & Sobestiansky, J. (2009). Uso de perfis sorológicos e bacteriológicos em suinocultura Serological and bacteriological profiles in pig production.
- Sauvage, A.C., Monclin, S.J., Elansary, M., Hansen, P. and Grauwels, M.F. (2019) Detection of intraocular *Leptospira spp.* by real-time polymerase chain reaction in horses with recurrent uveitis in Belgium. *Equine Vet J* 51, 299–303.
- Schuller, S., Francey, T., Hartmann, K., Hugonnard, M., Kohn, B., Nally, J. E., & Sykes, J. (2015). European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats. In *Journal of Small Animal Practice* (Vol. 56, Issue 3, pp. 159–179). Doi: 10.1111/jsap.12328.
- Schwink, K. L. (1992). Equine Uveitis. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, 8(3), 557–574. Doi: 10.1016/S0749-0739(17)30441-8.
- Sebastian, M., Giles, R., Roberts, J., Poonacha, K., Harrison, L., Donahue, J., & Benirschke, K. (2005). BRIEF COMMUNICATIONS AND CASE REPORTS Funisitis Associated with Leptospiral Abortion in an Equine Placenta. In *Vet Pathol* (Vol. 42).
- Sehgal SC. (2006). Epidemiological patterns of leptospirosis. *Indian J Med Microbiol.* 2006 Oct;24(4):310-1. doi: 10.4103/0255-0857.29405. PMID: 17185863.
- Sharma, M., Yadav, A. (2008). *Leptospirosis: Epidemiology, Diagnosis, and Control.*
- Shang ES., Exner MM., Summers TA., Martinich C., Champion CI., Hancock RE., Haake DA. (1995). The rare outer membrane protein, OmpL1, of pathogenic *Leptospira* species is a heat-modifiable porin. *Infect Immun.* 1995 Aug;63(8):3174-81. doi: 10.1128/iai.63.8.3174-3181.1995
- Silverstein, C. M., & Atlanta, G. (1953). Pulmonary Manifestations of Leptospirosis. *Sep*;61(3):327-34. Doi: 10.1148/61.3.327.
- Singh, C., & Roy-Chowdhuri, S. (2016). Quantitative real-time PCR: Recent advances. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1392, pp. 161–176). Humana Press Inc.

- Smythe L., Adler B, Hartskeerl RA, Galloway RL, Turenne CY, Levett PN. (2013). The International Committee On Systematics Of Prokaryotes Subcommittee On The Taxonomy Of. Classification of *Leptospira* genomospecies 1, 3, 4 and 5 as *Leptospira alstonii* sp. nov., *Leptospira vanthielii* sp. nov., *Leptospira terpstrae* sp. nov. and *Leptospira yanagawae* sp. nov., respectively. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013 May;63(Pt 5):1859-1862.
Doi: 10.1099/ijs.0.047324-0.
- Straub MH., & Foley JE.(2020). Cross-sectional evaluation of multiple epidemiological cycles of *Leptospira* species in peri-urban wildlife in California. *J Am Vet Med Assoc.* 2020 Oct 15;257(8):840-848. Doi: 10.2460/javma.257.8.840.
- Swadzba, M. E., Hauck, S. M., Naim, H. Y., Amann, B., Deeg, C. A., & Chatenoud, L. (2012). Retinal Glycoprotein Enrichment by Concanavalin A Enabled Identification of Novel Membrane Autoantigen Synaptotagmin-1 in Equine Recurrent Uveitis. *PLoS ONE*, 7(12).
Doi: 10.1371/journal.pone.0050929
- Sykes, J. E., Hartmann, K., Lunn, K. F., Moore, G. E., Stoddard, R. A., & Goldstein, R. E. (2011). 2010 ACVIM Small Animal Consensus Statement on Leptospirosis: Diagnosis, Epidemiology, Treatment, and Prevention. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(1), 1–13. Doi: 10.1111/j.1939-1676.2010.0654.x
- Takabe, K., Nakamura, S., Ashihara, M., & Kudo, S. (2017). Effect of osmolarity and viscosity on the motility of pathogenic and saprophytic *Leptospira*. In *Microbiology and Immunology* (Vol. 57, Issue 3, pp. 236–239).
Doi: 10.1111/1348-0421.12018.
- Tappero JW., Ashford DA., Perkins BA. (2000) *Leptospira* species (leptospirosis) In Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Principles and practice of infectious diseases. 2. Vol. 5. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000. pp. 2495–501.
- Tarigan, S., Susanti, Kusmiyati. (2016). Recombinant LipL32 Protein for Leptospirosis Detection in Indonesia. *Procedia Chemistry*. Vol 18. pp. 18-25.
Doi: 10.1016/j.proche.2016.01.004.

- Tilahun, Z., Reta, D., & Simenew, K. (2013). Global Epidemiological Overview of Leptospirosis. *International Journal of Microbiological Research*, 4(1), 9–15. Doi: 10.5829/idosi.ijmr.2013.4.1.7134.
- Timoney, J. F., Kalimthusamy, N., Velineni, S., Donahue, J. M., Artiushin, S. C., & Fettingner, M. (2011). A unique genotype of *Leptospira interrogans* serovar Pomona type kennewicki is associated with equine abortion. *Veterinary Microbiology*, 150(3–4), 349–353. Doi: 10.1016/j.vetmic.2011.02.049.
- Tömördy, E., Häsing, M; Spiess, B M (2010). The outcome of pars plana vitrectomy in horses with equine recurrent uveitis with regard to the presence or absence of intravitreal antibodies against various serovars of *Leptospira interrogans*. *Pferdeheilkunde Equine Medicine*, 26(2): 251-251. Doi: 10.5167/uzh-32906.
- Verma, A., Rathinam, S. R., Priya, C. G., Muthukkaruppan, V. R., Stevenson, B., & Timoney, J. F. (2008). LruA and LruB antibodies in sera of humans with leptospiral uveitis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 15(6), 1019–1023. Doi: 10.1128/CVI.00203-07
- Verma, A., Kumar, P., Babb, K., Timoney, J. F., & Stevenson, B. (2010). Cross-reactivity of antibodies against leptospiral recurrent uveitis-associated proteins A and B (LruA and LruB) with eye proteins. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(8). Doi: 10.1371/journal.pntd.0000778.
- Verma, A., Matsunaga, J., Artiushin, S., Pinne, M., Houwers, D. J., Haake, D. A., Stevenson, B., & Timoney, J. F. (2012). Antibodies to a novel leptospiral protein, LruC, in the eye fluids and sera of horses with *Leptospira*-associated uveitis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 19(3), 452–456. Doi: 10.1128/CVI.05524-11.
- Verma, A., Stevenson, B., & Adler, B. (2013). Leptospirosis in horses. *Veterinary Microbiology*, 167(1–2), 61–66. Doi: 10.1016/j.vetmic.2013.04.012.

- Vieira, M. L., Gama-Simões, M. J., & Collares-Pereira, M. (2006). Human leptospirosis in Portugal: a retrospective study of eighteen years. *International Journal of Infectious Diseases*, 10(5), 378–386.
Doi: 10.1016/j.ijid.2005.07.006.
- Villumsen S., Pedersen R, Krogfelt KA, Jensen JS. (2010). Expanding the diagnostic use of PCR in leptospirosis: improved method for DNA extraction from blood cultures. *PLoS One*. 2010 Aug 11;5(8):e12095. Doi: 10.1371/journal.pone.0012095.
- Waitkins SA. (1986). Leptospirosis as an occupational disease. *Br J Ind Med*. 1986;43:721–725. 10.1136/oem.43.11.721. Doi: 10.1136/oem.43.11.721.
- Weigand, M., Hauck, S. M., Deeg, C. A., & Degroote, R. L. (2021). Deviant proteome profile of equine granulocytes associates to latent activation status in organ specific autoimmune disease. *Journal of Proteomics*, 230. Doi: 10.1016/j.jprot.2020.103989.
- Weil A. (1886). Ueber eine eigentümliche, mit Milztumor, Icterus und Nephritis einhergehende akute Infektionskrankheit. *Dtsche Arch Klin Med*. 1886;39:209–232.
- Whitwell, K. E., Blunden, A. S., Miller, J., & Errington, J. (2009). Two cases of equine pregnancy loss associated with leptospira infection in england. *Veterinary Record*, 165(13), 377–378. Doi: 10.1136/vr.165.13.377.
- Wolff, JW., Broom, JC. (1917). The genus *Leptospira* Noguchi, 1917; problems of classification and a suggested system based on antigenic analysis. *Doc Med Geogr Trop*. 1954 Mar;6(1):78-95. PMID: 13173355.
- Wollanke B., Rohrbach BW., Gerhards H. (2001). Serum and vitreous humor antibody titers in and isolation of *Leptospira interrogans* from horses with recurrent uveitis. *J Am Vet Med Assoc*. 2001 Sep 15;219(6):795-800. Doi: 10.2460/javma.2001.219.795. PMID: 11561656.
- Wright, K., Ireland, J. L., & Rendle, D. I. (2018). A multicentre study of long-term follow-up and owner satisfaction following enucleation in horses. *Equine Veterinary Journal*, 50(2), 186–191. Doi: 10.1111/evj.12743.

- Wynwood, S. J., Graham, G. C., Weier, S. L., Collet, T. A., McKay, D. B., & Craig, S. B. (2014). Leptospirosis from water sources. *Pathogens and Global Health*, 108(7), 334–338.
Doi: 10.1179/2047773214Y.0000000156.
- Xu, J., Koizumi, N., & Nakamura, S. (2020). Crawling Motility on the Host Tissue Surfaces Is Associated With the Pathogenicity of the Zoonotic Spirochete *Leptospira*. *Frontiers in Microbiology*, 11.
Doi: 10.3389/fmicb.2020.01886
- Yadeta, W. Bashahun, G. M., & Abdela, N. (2016). Leptospirosis in animal and its public health implications: A review. *World Applied Sciences Journal*, 34(6), 845-853.
- Yan, W., Faisal, S. M., Divers, T., McDonough, S. P., Akey, B., & Chang, Y. F. (2010). Experimental leptospira interrogans serovar Kennewicki infection of horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24(4), 912–917.
Doi: 10.1111/j.1939-1676.2010.00507.x.
- Yasuda, PH., Steigerwalt, A. G., Sulzer, K. R., Kaufmann, A. F., Rogers, F., & Brenner², D. J. (1987). Deoxyribonucleic Acid Relatedness between Serogroups and Serovars in the Family Leptospiraceae with Proposals for Seven New *Leptospira* Species. In *International Journal Of Systematic Bacteriology* (Vol. 37, Issue 4).

