



**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO
AMAZONAS**

CAMPUS MANAUS ZONA LESTE

DEPARTAMENTO DE ENSINO E PÓS-GRADUAÇÃO

CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

REBECA LARISSA CASTRO SILVA

**FREQUÊNCIA DE LEPTOSPIROSE EM EQUINOS DE MANAUS E REGIÃO
METROPOLITANA NO ESTADO DO AMAZONAS**

MANAUS – AM

2021

REBECA LARISSA CASTRO SILVA

**FREQUÊNCIA DE LEPTOSPIROSE EM EQUINOS DE MANAUS E REGIÃO
METROPOLITANA NO ESTADO DO AMAZONAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina Veterinária do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM), como requisito parcial para obtenção do diploma de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientadora: Prof^a Isadora Karolina Freitas de Sousa.

MANAUS – AM

2021



Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

S586f

Silva, Rebeca Larissa Castro.

Frequência de leptospirose em equinos de Manaus e região metropolitana no estado do Amazonas / Rebeca Larissa Castro Silva. -- Manaus, 2021.

46 f.; il : color, 30 cm.

Inclui CD-ROM.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas – Campus Manaus Zona Leste, Curso de Medicina Veterinária, 2021.

Orientadora: Prof.^a Isadora Karolina Freitas de Sousa.

1. Amazonas. 2. Região metropolitana. 3. Epidemiologia. I. Sousa, Isadora Karolina Freitas de. II. Título.

CDD – 636.0896

REBECA LARISSA CASTRO SILVA

FREQUÊNCIA DE LEPTOSPIROSE EM EQUINOS DE MANAUS E REGIÃO METROPOLITANA NO ESTADO DO AMAZONAS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina Veterinária do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM), como requisito parcial para obtenção do diploma de Bacharel em Medicina Veterinária. Orientadora: Prof^a Isadora Karolina Freitas de Sousa

Aprovado em 31 de maio de 2021.

BANCA EXAMINADORA

Isadora Karolina Freitas de Sousa

Profa. Isadora Karolina Freitas de Sousa
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM)

Rejane dos Santos Sousa

Dra. Rejane dos Santos Sousa
Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará (UNIFESSPA)

Alexandre Alberto Tonin

Dr. Alexandre Alberto Tonin
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM)

MANAUS - AM

2021

AGRADECIMENTOS

A Deus por nunca ter desistido de mim, por ter me guiado, me protegido e me iluminado ao longo da caminhada.

À minha mãe, Roseanne Mara de Souza Castro, que sempre me incentivou a correr atrás dos meus sonhos, independente dos obstáculos, que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos que precisei e que foi o meu maior exemplo de garra e superação.

À minhas tias Rouse Castro, Rosangela Castro e Claudionora Castro pelos cuidados, carinho e incentivo.

À minha avó Graciete Rodrigues e ao meu avô Cecílio Rodrigues, por todo o amor e preocupação.

À minha prima Izabel Castro, por todo o apoio e auxílio prestados ao decorrer da longa caminhada.

Às minhas amigas, irmãs de coração e alma, Deydre Merlo e Vitória Rocha, por todo companheirismo, incentivo e ajuda durante os seis anos de faculdade.

À minha parceira de projetos Brenda Ferreira, por todo o apoio prestado durante as horas no campo e laboratório.

À minha orientadora Isadora Karolina Freitas de Sousa, por todo o apoio durante a graduação, pelo incentivo e por acreditar no meu potencial quando nem eu mesma acreditava.

Aos professores Dr. Alexandre Alberto Tonin e Dra. Rejane dos Santos Sousa, por toda ajuda prestada durante a realização do estudo.

A todos os meus professores do curso de graduação em Medicina Veterinária do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, que sempre estiveram dispostos a ensinar e prestar ajuda aos acadêmicos.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM), *Campus* Manaus Zona Leste, por ter permitido a realização desta graduação e as oportunidades durante essa longa jornada.

À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e colaboradores do LapLepto pela parceria durante a realização do estudo.

Aos tutores e tratadores por terem disponibilizado seus animais para realização do estudo.

À todas as pessoas que não mencionei, mas que contribuíram para a minha formação.

“Consagre ao Senhor tudo o que você faz, e os seus planos serão bem-sucedidos”.

Provérbios 16:3

FREQUÊNCIA DE LEPTOSPIROSE EM EQUINOS DE MANAUS E REGIÃO METROPOLITANA NO ESTADO DO AMAZONAS¹

RESUMO:

A ocorrência de leptospirose é significativamente maior no clima tropical do que nas regiões temperadas, especialmente em períodos com altos níveis de chuva. Em cavalos, a leptospirose pode variar de aguda a assintomática, mas estes animais podem desempenhar um papel importante na transmissão da leptospirose por meio da eliminação do agente no ambiente. Em relação aos equinos, entre os anos de 2004 e 2013, o rebanho Amazônico aumentou 30%. Assim, o objetivo do estudo foi determinar a frequência sorológica de leptospirose em cavalos pertencentes à Manaus e região metropolitana, estado do Amazonas, Brasil, bem como, determinar os principais sorogrupos envolvidos nas infecções desses animais. Dessa forma, durante o período compreendido entre agosto de 2018 e julho de 2019, foram colhidos soros de 198 cavalos para avaliação sorológica através do teste de microaglutinação microscópica, utilizando-se um painel contendo dez sorogrupos. Como resultado, observou-se que 92 animais (46,46%) testaram positivos para um ou mais sorovares de *Leptospira* spp., com maior prevalência dos sorogrupos Icterohaemorrhagiae e Pyrogenes. Portanto, com o aumento do rebanho equino na região e, conseqüentemente, maior interação entre criadores e animais, a identificação de reagentes para pelo menos um sorovar de *Leptospira* spp. alerta para a possível existência de reservatórios de cepas patogênicas para outros animais e seres humanos.

Palavras-chave: Amazonas. Região metropolitana. Epidemiologia. Equino. *Leptospira*.

¹ Artigo completo publicado (APÊNDICE): SOUSA, I. K. F.; SILVA, R. L. C.; SOUSA, R. S.; VIEIRA, C. E.; MELO, S.; QUEVEDO, G. P.; VON LAER, A. E.; LOVATO, L. T.; TONIN, A. A. Frequency of leptospirosis in horses in Manaus and metropolitan region in Amazonas State, Brazil. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v. 57, n. 4, p. 1-7, 2020.

ABSTRACT:

The occurrence of leptospirosis is significantly higher in the tropical climate than in temperate regions, especially in periods with high rainfall levels. In horses, leptospirosis can range from acute to asymptomatic but maintains an important role in the transmission of leptospirosis by eliminating the agent in the environment. Regarding horses, the Amazonas herd increased by 30% between 2004 and 2013. Thus, the study aimed to determine the serological frequency of leptospirosis in horses in Manaus and metropolitan regions, in the State of Amazonas, Brazil as well as to assess the main serogroups involved in the infections of these animals. For this purpose, from August 2018 to July 2019, serum from 198 horses was evaluated through the microscopic agglutination test with a panel of 10 serogroups. As a result, 92 horses (46.46%) were found to be positive for one or more *Leptospira* serovars, with the highest prevalence of serogroups Icterohaemorrhagiae and Pyrogenes. Therefore, with the increase in the equine herd in the region and, consequently, greater interaction between breeders and animals, the identification of reagents to at least one serovar of *Leptospira* spp. signals the possible existence of reservoirs of pathogenic strains for other animals and man.

Keywords: Amazonas. Metropolitan region. Epidemiology. Equine. *Leptospira*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Títulos de anticorpos para sorogrupo e sorovares de *Leptospira* spp. em cavalos no Estado do Amazonas, Brasil. Coleta de sangue realizada durante o período de agosto de 2018 a julho 2019.....29

Tabela 2 - Valores de hematócritos e avaliação do fibrinogênio em cavalos com soroaglutinação positiva e negativa para *Leptospira* spp. em Manaus-AM.....30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Venopunção da jugular externa em equino.....	25
Figura 2: Centrifugação das amostras coletadas.	25
Figura 3: Preparação de capilares para obtenção dos valores de hematócrito.	26
Figura 4: Amostras de soro pós centrifugação.	26

LISTA DE ABREVIATURAS

AM - Amazonas

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA - Ensaio de imunoadsorção enzimática

EMJH - Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris

LPS – Lipopolissacarídeo

MAT - Teste de aglutinação microscópica

mm – Milímetro

OIE - Organização Mundial de Saúde Animal

PCR – Reação em cadeia de polimerase

RO - Rondônia

SAM - Soroaglutinação microscópica

spp. - Espécies

UFMS – Universidade Federal de Santa Maria

LISTA DE SÍMBOLOS

g/dL – Gramas por decilitro

> – Maior que

< – Menor que

μL – Microlitro

μm – Micrómetro

% - Por cento

® - Registrada no Brasil

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Agente etiológico.....	17
2.2 Leptospirose e saúde pública.....	17
2.3 Leptospirose em equinos.....	19
2.3.1 Sinais clínicos e alterações laboratoriais.....	20
2.3.2 Diagnóstico.....	20
2.3.3 Prevenção e controle.....	21
3 OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo geral.....	23
3.2 Objetivos específicos	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Local e período	24
4.2 Animais	24
4.3 Coleta de amostras.....	24
4.4 Diagnóstico sorológico	27
4.5 Análise hematológica.....	27
4.6 Análise de dados	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
6 CONCLUSÃO.....	33
REFERÊNCIAS	34
APÊNDICE.....	39

1 INTRODUÇÃO

O Estado do Amazonas detém um rebanho de 15.479 equinos, com aumento de 30% entre os anos de 2004 e 2013. O crescimento ocorreu em todos os estados da região Norte, com taxas entre 0,57% no Pará e 98% no Acre. No entanto, esta taxa diverge de estados tradicionais na criação de equinos, a exemplo de Minas Gerais, Bahia e São Paulo, que no mesmo período apresentaram diminuição do número efetivo de animais em seus rebanhos (BRASIL, 2016).

O município de Manaus, capital do estado do Amazonas, apresenta clima tropical úmido, com temperatura média acima de 22°C, e chuva abundante durante todo o ano, sendo mais frequente no inverno regional que compreende o período de janeiro a abril. As condições ambientais, clima úmido e tropical, altas temperaturas e períodos de chuvas fortes, bem como a presença de roedores e áreas sem saneamento e coleta inadequada de lixo, apresentam uma estrutura ecológica e sanitária favorável à sobrevivência de bactérias do gênero *Leptospira*, e conseqüentemente, à ocorrência da leptospirose, doença infecciosa aguda que afeta seres humanos e animais (HOMEM *et al.*, 2001). Sua transmissão ocorre em humanos por meio do contato com a urina de animais silvestres ou domésticos infectados por esse microrganismo (ADLER; MOCTEZUMA, 2010).

A presença de espécie susceptível em uma região com condições ambientais favoráveis a ocorrência de leptospirose já justifica a necessidade de estudos de soroprevalência da enfermidade na população humana e animal, principalmente por se tratar de uma zoonose com alta taxa de mortalidade entre humanos.

Considerando as informações sobre o aumento do número de equinos que vivem em áreas urbanas do município de Manaus, destinados às atividades de lazer, trabalho e esporte, e o conseqüente contato diário de pessoas com esses animais, seja no manejo, treinamentos ou sessões de equoterapia, temos argumentos que aponta, para o aumento no risco de exposição e contaminação de seres humanos e demais animais susceptíveis.

Na Região Norte, os trabalhos com soroprevalência de leptospirose em animais são escassos, especialmente no estado do Amazonas, apontando a necessidade de apoio e incentivo à realização de estudos sobre esse tema.

Neste contexto, torna-se indispensável o conhecimento da prevalência de doenças infecciosas bem como a leptospirose, que causa impacto econômico negativo nos sistemas de produção de equinos, sendo principalmente relacionadas a perdas reprodutivas, e risco a saúde pública, por seu caráter zoonótico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Agente etiológico

A palavra "Leptospira" deriva do grego *leptos* (finos) e do latim *spira* (enrolado). As leptospiros medem cerca de 0,1 µm, de diâmetro e variam de 6 a 20 µm de comprimento. As células têm extremidades pontiagudas, uma ou ambas, as quais formam um gancho característico. A motilidade da bactéria é conferida através da rotação de duas flagelas axiais subjacentes à membrana, que são inseridas em extremidades opostas da célula e estendem em direção à região central (GOLDSTEIN; CHARON, 1988).

A estrutura geral da *Leptospira* spp. assemelha-se à de bactérias gram-negativas devido a presença de lipopolissacarídeo (LPS) incorporado ao folheto externo de sua membrana externa, além disso, contém peptidoglicano em sua membrana interna e espaço periplasmático (ADLER, 2014).

O gênero *Leptospira* é classificado em duas espécies, sendo elas: *L. interrogans* e *L. biflexa*, patogênica e não patogênica, respectivamente. Além disso, é válido ressaltar que existe uma classificação de espécies definidas por seu grau de relação genética, determinado pela reassociação do DNA. Atualmente, têm-se 14 espécies nomeadas, sendo que, dentro de cada espécie há um grande número de sorovares, cerca de 250 sorovares de leptospiros patogênicos foram descritos. É válido ressaltar que a especificidade de cada sorovar é conferida pela membrana de lipopolissacarídeo (LPS) (LEVETT; HAAKE, 2010).

2.2 Leptospirose e Saúde Pública

A leptospirose caracteriza-se como uma enfermidade infectocontagiosa que acomete animais domésticos, selvagens e o homem. A doença é considerada uma zoonose bacteriana com grande difusão mundial, especialmente na América Latina, com taxas de letalidade que variam entre 5 e 20% (CASTRO, 2010).

Segundo Haake & Levett (2015), a gravidade da doença é dependente de três fatores, sendo eles: condições epidemiológicas da região, susceptibilidade do hospedeiro e a virulência do patógeno.

Em humanos, a leptospirose é sempre adquirida a partir de uma fonte animal, a transmissão entre humanos pode ser considerada inexistente, caracterizando a doença como uma zoonose. Leptospiras patogênicas sobrevivem nos túbulos renais proximais dos rins de portadores, mas outros tecidos e órgãos também podem servir como fonte de infecção. Uma vez colonizando os rins, as leptospiras são excretadas na urina e podem contaminar o solo, águas superficiais, córregos e rios. As infecções de animais ou humanos ocorrem a partir do contato direto com a urina ou indiretamente da água contaminada (ADLER; MOCTEZUMA, 2010).

Vasylieva *et al.* (2017) afirma que os animais de fazenda e pequenos mamíferos são reservatórios paralelos responsáveis pela introdução da infecção nos seres humanos através do meio ambiente.

O principal reservatório no ambiente urbano são os roedores sinantrópicos (*Rattus norvegicus*, *Rattus rattus* e *Mus musculus*) sendo o *R. norvegicus* o principal portador da *Leptospira interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae, a mais patogênica ao ser humano. Já no meio rural o contato com os animais predispõe ao risco de infecção por *Leptospira* spp. devido a aproximação e manipulação de tecidos animais (ADLER; MOCTEZUMA, 2010).

Especialistas estimam que anualmente cerca de 1,03 milhão de pacientes e 58.900 mortes são registradas devido à leptospirose. Observa-se a maior incidência e mortalidade no Sul e Sudeste da Ásia, Oceania, América Latina e África Oriental (COSTA *et al.*, 2015).

No Brasil a doença é considerada endêmica em todas as unidades da federação e epidêmica principalmente em períodos chuvosos. Em Manaus, entre os anos de 2000 e 2010 foram notificados 665 casos de leptospirose em humanos, 339 confirmados, e taxa de letalidade de 10,3% (n=35). O maior número de casos ocorreu no período de intensas chuvas, que compreende os meses de maio, março e abril. Os casos estão associados a condições socioambientais precárias, como ausência de saneamento básico (JESUS *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2016).

2.3 Leptospirose em equinos

Pesquisas realizadas na última década no Brasil demonstram grande variação na soroprevalência da leptospirose em equinos. A prevalência no país varia entre 45 e 74,1%; 8 e 62,5%; 79,3 e 100%; 17,9 e 71,9% e 60 e 87,1% nas Regiões Centro Oeste, Nordeste, Norte, Sudeste e Sul, respectivamente (RIBEIRO, 2015).

Nas regiões endêmicas as formas aguda e subclínica de leptospirose são comuns nas infecções em equinos. Além disso, a infecção é mais frequente do que a doença clínica. A leptospirose acarreta sério impacto negativo na equinocultura, incluindo perdas devido a abortos. Outras manifestações clínicas da infecção incluem a disfunção renal, disfunção hepática e uveíte recorrente, que é considerada a maior causa mundial de perda de visão em equinos (ARTIUSHIN *et al.*, 2012; HAMOND *et al.*, 2012; POLLE *et al.*, 2014).

A fonte de infecção é um animal infectado que contamina o pasto, a água e os alimentos com urina infectada, fetos abortados e secreções uterinas. Uma vez no ambiente, as leptospiras podem sobreviver por várias semanas em condições favoráveis, que é um ambiente preferencialmente úmido. A porta usual de entrada da bactéria é pela penetração em membrana mucosa e pele, mas ocasionalmente pode ocorrer também via inalação e ingestão, sendo que o resultado da exposição dependerá da dose, virulência e susceptibilidade do hospedeiro (MEGID; RIBEIRO; PAES, 2016).

Os equinos podem ter um papel importante na transmissão da leptospirose pela eliminação do agente no ambiente. Mesmo com uma alta concentração de anticorpos no hospedeiro, a *Leptospira* spp. pode sobreviver e se multiplicar, sendo eliminadas na urina pelos equinos por pelo menos 30 dias pós-inoculação ou até por 2-3 meses (HAMOND *et al.*, 2013).

A umidade presente no solo são os fatores mais importantes para a permanência e persistência do agente no solo, o qual pode viver até 183 dias em solo úmido, mas sobrevive apenas 30 minutos quando este está seco. Em solo em condições médias a sobrevivência provável do organismo é de no mínimo 42 dias. A sobrevivência é maior em água parada do que em água corrente. Apesar disso, existem relatos de sobrevivência do agente em água corrente

durante um período de até 15 dias (RADOSTITS *et al.*, 2007; MEGID; RIBEIRO; PAES, 2016).

2.3.1 Sinais Clínicos e Alterações Laboratoriais

Os sinais clínicos mais visíveis da leptospirose em equinos são: febre moderada acompanhada de anorexia. Nos casos mais graves, expansão da conjuntiva, aparecimento de petéquias nas mucosas, hemoglobinúria, anemia, icterícia, depressão e fraqueza durando de 5 a 18 dias. Neonatos infectados no útero podem apresentar severos sinais clínicos com risco de óbito (RADOSTITS *et al.*, 2007; SMITH, 2014).

De 2 a 8 meses depois do início da infecção, alguns equinos podem desenvolver oftalmia periódica, inflamação da íris, uveíte e cegueira noturna. A uveíte recorrente (oftalmia periódica) tem sido reconhecida como uma sequela da leptospirose tanto em pacientes equinos como em pacientes humanos. Em equinos a uveíte tem sido descrita após a infecção natural e experimental. Esta condição pode ocorrer meses ou anos após a infecção, embora alguns casos possam ser agudos. Os sinais da uveíte recorrente incluem miose, blefaroespasmo, fotofobia e ocasionalmente ceratite. Cronicamente podem existir corioretinite e alteração da cor da íris (RADOSTITS *et al.*, 2007; SMITH, 2014; MEGID; RIBEIRO; PAES, 2016).

A avaliação laboratorial pode revelar leucocitose, hiperfibrinogenemia, azotemia e isostenúria (RADOSTITS *et al.*, 2007). Provas bioquímicas devem ser utilizadas para o diagnóstico de alterações renais e hepáticas induzidas pela leptospirose (PESCADOR *et al.*, 2004).

2.3.2 Diagnóstico

O diagnóstico da infecção por *Leptospira* spp., nos seres humanos e animais, é realizado por métodos laboratoriais diretos e indiretos. Os métodos diretos de diagnóstico da leptospirose são compostos pelo isolamento do agente e identificação de antígenos de *Leptospira* spp. em tecidos e fluidos corporais usando como métodos de identificação a imunofluorescência, imunohistoquímica e vários métodos de reação em cadeia de polimerase (PCR). Já, os métodos indiretos são baseados na detecção de anticorpos específicos,

com discriminação de sorovares. Dentre as principais técnicas indiretas, podemos destacar o ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA), imunofluorescência indireta e testes de aglutinação, como por exemplo, o teste de soroaglutinação microscópica (SAM). A Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) utiliza como referência internacional o SAM, cuja metodologia se encontra descrita no Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (OIE, 2014).

A identificação dos sorovares envolvidos nas reações positivas de aglutinação determina as ações de profilaxia e o controle da leptospirose em equinos que poderão indicar a origem e os potenciais reservatórios dos sorovares e, portanto, as ações indicadas para a redução da contaminação ambiental e da exposição de equinos aos fatores associados a infecção por *Leptospira* spp. (ADLER; MOCTEZUMA, 2010; PINNA, 2011).

2.3.3 Prevenção e Controle

Haake & Levett (2015) afirmam que as estratégias de prevenção da leptospirose humana e animal são baseadas em questões como: conscientização sobre a doença, conhecimento a respeito da epidemiologia e dos mecanismos de transmissão. Dessa forma, uma vez que a epidemiologia local e os riscos de transmissão tenham sido definidos, é possível reduzir consideravelmente o risco, bem como a realização de implementação de medidas protetivas a exemplo de imunização e quimioprofilaxia.

É válido ressaltar que tanto em animais quanto em humanos as vacinas devem consequentemente conter os mesmos sorovares presentes nas populações a serem imunizadas, enfatizando a importância da realização de levantamentos sorológicos com o intuito de se conhecer a prevalência dos sorovares em determinadas espécies animais e região (LEVETT, 2001). A imunização em humanos, principalmente em profissionais com risco ocupacional, é feita na Europa e Ásia, por meio de vacinas inativadas (HAAKE & LEVETT 2015).

Além disso, o controle de roedores, quarentena, exame constando soronegatividade, esquemas de vacinação eficiente, técnicas de drenagem e canalização de cursos de água são medidas eficientes para evitar a

disseminação da infecção por *Leptospira* spp. em um haras. Assim como, a destinação correta de esgotos, excretas, restos placentários e de abortamento, higienização de benfeitorias e de equipamentos zootécnicos auxiliam no controle e prevenção da leptospirose (NETA *et al.*, 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Determinar a frequência de equinos soropositivos para leptospirose no município de Manaus.

3.2 Objetivos Específicos

- Identificar os sorogrupos prevalentes no município de Manaus;
- Verificar alterações hematológicas em equinos soropositivos no município de Manaus.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local e período

O estudo foi realizado em Manaus, capital do estado do Amazonas, durante o período compreendido entre agosto de 2018 a julho de 2019. A área do estudo é caracterizada por clima tropical, quente e úmido, com temperatura média anual variando entre 23,4 e 31,9°C e umidade relativa do ar em torno de 80%, com média anual de precipitação de 2.301,2 mm. Embora o período chuvoso ocorra durante todo do ano, o volume de chuva é mais abundante entre os meses de janeiro a abril, e o período de cheia do rio Negro na altura de Manaus ocorre entre o período de maio a agosto, sendo mais frequentes em junho e julho (BRASIL, 2018).

4.2 Animais

Foram utilizados 198 animais, provenientes de 17 propriedades localizadas em Manaus, capital do estado do Amazonas, e sua região metropolitana, pertencente à região Norte do Brasil. Não houve predomínio de raça, sexo ou idade. Todos os animais eram garanhões, criados em um sistema misto (no campo durante o dia e alojado à noite). Para obtenção de uma cobertura mais ampla e amostragem representativa da localização optou-se por não selecionar raça, sexo ou idade média. É válido ressaltar que nenhum dos animais havia sido vacinado contra leptospirose.

4.3 Coleta de amostras

Foram coletadas amostras de sangue a partir da venopunção da jugular externa com auxílio de tubos vacutainer®. Para realização de análises hematológicas, as amostras foram coletadas em tubos de ensaio individuais contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), resfriados a 4 °C, a análise foi executada em um período máximo de 12 horas após a coleta. Para separação de soro, as amostras de sangue (em tubos de ensaio sem anticoagulante) foram centrifugadas em 1.000g x 15 minutos, seguido por aliquotação individual em microtubos eppendorf® e congelados a - 20 °C para realização da sorologia subsequente.



Figura 1. Venopunção da jugular externa em equino.
Fonte: Rebeca Silva (2019).



Figura 2. Centrifugação das amostras coletadas.
Fonte: Rebeca Silva (2019).



Figura 3. Preparação de capilares para obtenção dos valores de hematócrito.
Fonte: Rebeca Silva (2019).



Figura 4. Amostras de soro pós centrifugação.
Fonte: Rebeca Silva (2019).

4.4 Diagnóstico Sorológico

O diagnóstico sorológico da leptospirose foi realizado no Laboratório de Diagnóstico leptospirose na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). As amostras de soro foram testadas para anticorpos anti-*Leptospira* a partir do teste de soroaglutinação microscópica (SAM) (COLE *et al.*, 1973; GALTON *et al.*, 1965), usando antígenos vivos cultivados em meio líquido Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) livres de contaminação ou auto-aglutinação, como recomendado pela Organização Mundial da Saúde (2012).

Um painel completo de dez sorogrupos (incluindo 13 sorovares de referência) foram usados como antígenos de teste: sorogrupo Sejroe (sorovares Hardjo [subtipo Hardjo-prajitno] e Wolffi), sorogrupo Grippotyphosa (sorovar Grippotyphosa), sorogrupo Canicola (sorovar Canicola), sorogrupo Icterohaemorrhagiae (sorovares Icterohaemorrhagiae e Copenhageni), sorogrupo Australis (sorovares Australis e Bratislava), sorogrupo Pomona (sorovar Pomona) e sorogrupo Autumnalis (sorovar Butembo), sorogrupo Pyrogenes (sorovar Pyrogenes), sorogrupo Ballum (sorovar Ballum) e sorogrupo Tarassovi (sorovar Tarassovi).

As amostras de soro diluídas foram adicionadas em série as suspensões vivas de leptospiras, 13 sorovares, em placa de microtitulação (96 poços) e incubadas à temperatura ambiente por 2 a 4 horas. A presença ou ausência de aglutinação foi examinada usando microscopia de campo escuro a 100 × ampliação. Os títulos foram calculados com base na maior diluição sérica que aglutinou ao menos 50% das leptospiras, para cada sorovar utilizado (COLE *et al.*, 1973; GALTON *et al.*, 1965).

4.5 Análise Hematológica

Para determinar o fibrinogênio, a técnica de precipitação térmica descrita por Schalm (1970) foi empregada, fazendo-se uso da refratometria. Quanto ao hematócrito, este foi avaliado através da técnica de microcentrifugação. Baseado em valores de hematócritos e concentração de fibrinogênio, os animais foram classificados como anêmicos (hematócrito <32%), limite inferior (hematócrito 32-33%) e não anêmicos (hematócrito ≥34%), com hiperfibrinogemia (fibrinogênio >400 g/dL) e fibrinogênio normal (fibrinogênio <400 g/dL).

4.6 Análise de dados

Os dados foram analisados utilizando o software Excel 2016® para a preparação de planilhas, sendo apresentado com a sua distribuição absoluta e relativa.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que a partir de 198 cavalos avaliados, 92 foram positivos para um ou mais sorovares de *Leptospira*, o que representa 46,46% do total de animais estudados. Houve uma alta frequência de animais reagentes aos sorogrupos Icterohaemorrhagiae e Pyrogenes, como pode ser observado na tabela 1.

A tabela 2 traz os resultados do hematócrito e fibrinogênio, onde 19 (20,65%) animais soropositivos apresentaram anemia, enquanto 14 (15,22%) apresentaram-se no limite inferior de hematócrito. Ainda assim, 15 (16,30%) dos animais soropositivos apresentaram hiperfibrinogênese.

Tabela 1 – Títulos de anticorpos para sorogrupo e sorovares de *Leptospira* spp. em cavalos no Estado do Amazonas, Brasil. Coleta de sangue realizada durante o período de agosto de 2018 a julho 2019.

Sorogrupo	Sorovar	100	200	400	800	Nº de animais
ICT	ICT	35	10	1	-	46
	COP	9	9	1	-	19
PYR	PYR	20	18	5	1	44
BAL	BAL	10	7	2	-	19
TAR	TAR	5	8	3	-	16
CAN	CAN	10	3	1	-	14
	AUS	3	2	-	-	5
SEJ	BRA	1	-	-	-	1
	HAR	-	2	1	-	3
	WOL	1	-	1	-	2
GRI	GRI	1	1	-	-	2
Total		95	60	15	1	

FONTE: SOUSA (2020).

Obs. AUS: Australis; BAL: Ballum; BRA: Bratislava; CAN: Canicola; COP: Copenhageni; GRI: Grippotyphosa; HAR: Hardjo-prajitno; ICT: Icterohaemorrhagiae; PYR: Pyrogenes; SEJ: Sejroe; TAR: Tarassovi; WOL: Wolffi

Tabela 2 – Valores de hematócritos e avaliação do fibrinogênio em cavalos com sorologia positiva e negativa para *Leptospira* spp. em Manaus – AM.

Animais	Soroaglutinação		Total
	Positiva	Negativa	
Anêmico (<32%)	19	25	44
Limítrofe (32-33%)	14	18	32
Não Anêmico (≥34%)	59	63	122
Hiperfibrinogenemia	15	17	32
Fibrinogênio Normal	77	89	166

FONTE: SOUSA (2020).

Pesquisas realizadas na última década no Brasil mostraram grande variação na soroprevalência da leptospirose em cavalos. A prevalência nas diferentes regiões do Brasil varia entre 45 e 74,1% (Centro-Oeste), 8 e 62,5% (Nordeste), 79,3% e 100% (Norte), 17,9 e 71,9% (Sudeste) e 60 e 87,1% (Sul) (RIBEIRO, 2015).

Dos 198 animais testados, 40 apresentaram aglutininas anti-leptospira positivas para apenas um sorovar, 16 para *Icterohaemorrhagiae* (40%), 15 para *Pyrogenes* (37,5%), dois para *Copenhageni* (5%), dois para *Ballum* (5%), três para *Tarassovi* (7,5%) e dois para *Canicola* (5%), enquanto os outros animais positivos (52) apresentaram coaglutinação, o que poderia ser infecção por mais de um sorovar ou reações cruzadas entre sorovares (LEVETT, 2001).

Em estudo realizado no estado do Pará, das 37 amostras de soro avaliadas, 100% (37/37) mostraram uma reação contra um ou mais sorovares de *Leptospira* spp. Apenas o sorovar *Copenhageni* não reagiu com qualquer uma das amostras testadas (MORAIS *et al.*, 2010).

Um estudo de pesquisa e análise sorológica realizado com cavalos no Rio Grande do Sul (2003) constatou que em 1.169 amostras analisadas, 871 (74,51%) eram reagentes e 298 (25,49%) não reagiram com os sorovares testados. Os sorovares prevalentes foram: *Bratislava* (19,92%), seguido por *Copenhageni* (15,06%), (PIRES *et al.*, 2005), enquanto no estado de Pernambuco, a análise sorológica de 100 equinos demonstrou a prevalência de sorovares *Patoc* (35,71%), *Butembo* (32,14%) e *Sentot* (14,20%) (ALVES *et al.*, 2016). Estes estudos corroboraram parcialmente com os resultados alcançados por Pires *et al.* (2005), onde observou-se a predominância sorológica do sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* (que inclui o sorovar *Copenhageni*). Por outro

lado, o resultado sorológico principal está relacionado ao sorogrupo Pyrogenes, onde observam-se diferenças quando comparados com os outros estudos mencionados acima. Isso atrai atenção à variação epidemiológica da leptospirose em todo o território brasileiro.

L. interrogans sorotipo Icterohaemorrhagiae, pertencente ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae possui os roedores sinantrópicos como seu principal hospedeiro de manutenção, além de outros não sinantrópicos como o porco-da-índia brasileiro (MONTE *et al.*, 2013) e capivaras (LANGONI *et al.*, 2016). O sorovar Icterohaemorrhagiae tem sido descrito como o mais prevalente em cavalos em diversos estudos soroepidemiológicos no Brasil, como descreveu Lilenbaum (1998) no Estado do Rio de Janeiro; Fávero *et al.* (2002) em animais de diferentes regiões brasileiras; Langoni *et al.* (2004) nos Estados de São Paulo, Goiás e Mato Grosso do Sul; e Hashimoto *et al.* (2007) no Estado do Paraná, o que corrobora com estes resultados.

É importante enfatizar que Icterohaemorrhagiae é o sorovar mais frequente encontrado em cavalos e um dos principais sorovares responsáveis pela maioria das infecções em humanos observadas em áreas urbanas em todo o mundo (FARIA *et al.*, 2008). Pode-se notar que o aumento na ocorrência deste sorovar justifica o assentamento de práticas especiais para o controle de roedores em fazendas (MEGID *et al.*, 2016).

O sorovar Pyrogenes, pertencente ao sorogrupo Pyrogenes, tem baixa prevalência em cavalos de outras regiões do Brasil. No entanto, no Pará (MORAIS *et al.*, 2010), assim como neste estudo, observou-se alta prevalência de Pyrogenes, o que pode sugerir a manutenção deste sorovar por outros animais domésticos ou animais silvestres que vivem na região amazônica. O sorovar Pyrogenes foi isolado pela primeira vez no Brasil de mamíferos selvagens (*Nectomys squamipes*) em áreas próximas a São Paulo (SANTA ROSA *et al.*, 1980) e posteriormente detectado em cães de vários estados (AGUIAR *et al.*, 2007; MAGALHÃES *et al.*, 2006; QUERINO *et al.*, 2003). Na região amazônica, um estudo sorológico envolvendo cães do município de Monte Negro (RO) mostrou que o sorovar Pyrogenes foi o segundo mais prevalente nesta espécie (AGUIAR *et al.*, 2007), o que pode sugerir a transmissão deste sorovar entre cães e cavalos nesta região.

Além da participação na cadeia de transmissão, é importante correlacionar a sororreatividade com sinais clínicos, ou mudanças nos padrões fisiológicos dos animais. Nesse sentido, dentro do grupo soropositivos (92 animais), 19 apresentaram anemia, com hematócrito entre 27-31%, 14 com hematócrito limítrofe entre 32-33%, e 59 animais com hematócrito normal com valores variando de 34 a 52%.

Embora a soropositividade dos animais para *Leptospira* spp. não necessariamente indique que o animal tenha um quadro clínico agudo da doença, mas que em algum momento de sua vida ele teve contato com as bactérias, nas formas mais graves, pode-se observar: anemia, hiperfibrinogenemia, petéquias hemorrágicas na mucosa, icterícia, lesões hepáticas, hematúria, hemoglobinúria, leucocitose com neutrofilia ou linfocitose, azotemia, isostenúria, depressão geral, sinais neurológicos, insuficiência renal (principalmente em potros) e morte (DONAHUE, 1995; LILENBAUM, 1998; PINHEIRO *et al.*, 1985; RADOSTITS *et al.*, 2007). Baseado nisso, a presença de anemia e proteína de fase aguda (fibrinogênio) foi avaliada para verificar a saúde dos equinos.

A leptospirose provoca anormalidades clínicas que podem levar a mudanças significativas no quadro hematológico e outros achados laboratoriais. A contagem de eritrócitos diminuída, baixa concentração de hemoglobina e linfócitos são achados comuns de laboratório (TONIN *et al.*, 2012). Leucocitose, neutrofilia, eosinopenia, e linfopenia, juntamente com alta concentração de bilirrubina sérica também foram relatados em leptospirose equina (PINNA *et al.*, 2010).

A avaliação laboratorial de animais afetados por leptospirose pode revelar hiperfibrinogenemia. Em relação a este parâmetro, entre os animais positivos para *Leptospira* spp., 15 apresentaram hiperfibrinogenemia, com 60% dos casos tendo o envolvimento de sorovar Pyrogenes isolados ou em coagulação. Ao contrário de nossos resultados, relativos aos níveis de anemia e fibrinogênio, em um estudo sorológico em cavalos, Farias (2019) mostrou que não havia diferença na contagem sanguínea, concentração de fibrinogênio, e bioquímico entre animais soropositivos e soronegativos para *Leptospira* spp.

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos no estudo, pode-se afirmar que houve alta frequência de soropositividade para *Leptospira* spp. em cavalos no estado do Amazonas, Brasil, indicando a existência de uma alta frequência de reação aos sorogrupos Icterohaemorrhagiae e Pyrogenes.

Além disso, observou-se que grande parte dos animais que apresentaram hiperfibrinogenemia foram soropositivos para o sorogrupo Pyrogenes, isolado ou em coaglutinação.

Sendo assim, com o aumento do rebanho equino na região e, conseqüentemente, maior interação entre criadores e animais, a identificação de sorogrupos reagentes de *Leptospira* spp. sinaliza a possível existência de reservatórios e de cepas patogênicas para outros animais e para o homem.

REFERÊNCIAS

ADLER, B.; MOCTEZUMA, A. P. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, p. 287-296, 2010.

AGUIAR, D.M.; CAVALCANTE, G.T.; MARVULO, M.F.V.; SILVA, J.C.R.; PINTER, A.; VASCONCELLOS, S.A.; MORAIS, Z.M.; LABRUNA, M.B.; CAMARGO, L.M.A.; GENNARI, S.M. Fatores de risco associados à ocorrência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em cães do município de Monte Negro, Rondônia, Amazônia Ocidental Brasileira. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.**, v. 59, n. 1, p. 70, 2007.

ALVES, J.R.A.; OLIVEIRA, K.D.S.; COSTA, D.F.; FERNANDES, L.G.; HIGINO, S.S.S.; ALVES, C.J.; SANTOS, C.S.A.B.; AZEVEDO, S.S.; Epidemiological characterization of leptospirosis in horses in the state of Pernambuco, northeastern Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 83, p. 1-5, 2016.

ARTIUSHIN, S. C.; TIMONEY, J. F.; BALASURIYA, U. B.; EROL, E.; SELLS, S. F. Real-time PCR for detection of *Leptospira interrogans* serovar Pomona type kennewicki in equine clinical specimens. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo**. Brasília-DF: MAPA, 2016. 54p.

BRASIL, Instituto Nacional de Meteorologia - INMET. Instituto Nacional de Meteorologia. Normais climatológicas do Brasil. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=clima/normaisclimatologicas>> Acesso em: 3 de janeiro de 2021.

CASTRO, R.F. La situacion actual de las zoonosis más frecuentes en el mundo. **Gaceta Médica de México**, v.146, p. 423-429, 2010.

COLE, J.R.; SULZER, C.R.; PULSELLY, P.R. Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test. **Journal of Applied Microbiology**, v. 25, n. 6, p. 976-980, 1973.

COSTA, F.; HAGAN, J.E.; CALCAGNO, J.; KANE, M.; TORGERSON, P.; MARTINEZ-SILVEIRA, M.S. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **PLOS Neglected Tropical Diseases**., v. 9, n. 9, 2015.

DONAHUE, M. Equine leptospirosis. **Equine Disease Quarterly**, v. 3, n. 4, p. 4-5, 1995.

FARIA, M.T.; CALDERWOOD, M.S.; ATHANAZIO, D.A.; MCBRIDE, A.J.A.; HARTSKEERL, R.A.; PEREIRA, M.M.; KO AI; REIS, M.G. Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from na urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. **Acta Tropica**, v. 108, n. 1, p. 1-5, 2008.

FARIAS, D.K. Aspectos soropidemiológicos e laboratoriais da leptospirose em equinos. **Tese** (doutorado). Lages: Programa de Pós graduação em Ciência Animal, Universidade do Estado de Santa Catarina; 2019.

FAVERO, A.C.M.; PINHEIRO, S.R.; VASCONCELLOS, A.S.; MORAIS, Z.M.; FERREIRA, F.; FERREIRA, NETO J.S. Sorovares de leptospirosas predominantes em exames sorológicos de bubalinos, ovinos, caprinos, equinos, suínos e cães de diversos estados brasileiros. **Ciência Rural**, v. 32, p. 613-619, 2002.

GALTON, M.M.; SULZER, C.R.; SANTA ROSA, C.A.; FIELDS, M.J. Application of a microtechnique to the agglutination test for leptospiral antibodies. **Journal of Applied Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 81-85, 1965.

GOLDSTEIN, S.F.; CHARON, N.W. Motility of the spirochete *Leptospira*. *Cell Motil Cytoskelet*, v. 9, p. 101-110, 1988.

HAAKE, D. A.; LEVETT, P. N., *Leptospira* and Leptospirosis, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, p. 65, v. 387, 2015.

HAMOND, C.; MARTINS, G.; LAWSON-FERREIRA, R.; MEDEIROS, M. A.; LILENBAUM, W. The role of horses in the transmission of leptospirosis in an urban tropical area. **Epidemiology and Infection**, v. 141, p. 33-35, 2013.

HAMOND, C.; MARTINS, G.; LILENBAUM, W. Subclinical leptospirosis may impair athletic performance in racing horses. **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, p. 1927-1930, 2012.

HASHIMOTO, V.Y.; GONÇALVES, D.D.; SILVA, F.G.; OLIVEIRA, R.C.; ALVES, L.A.; REICHMANN, P.; MULLER, E.E.; FREITAS, J.C.; Occurrence of antibodies against *Leptospira* spp. in horses of the urban area of Londrina, Paraná. Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 49, n. 5, p. 327-330, 2007.

HOMEM, V.S.F.; HEINEMANN, M.B.; MORAES, Z.M.; VASCONCELLOS, S.A.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J.S. Estudo epidemiológico da leptospirose bovina e humana na Amazônia Oriental Brasileira. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.34, p.173-180, 2001.

JESUS, M. S.; SILVA, L. A.; LIMA, K. M. S.; FERNANDES, O. C. C. Cases distribution of leptospirosis in City of Manaus, State of Amazonas, Brazil, 2000-2010. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, p. 713-716, 2012.

LANGONI, H.; SILVA, A.V.; PEZERICO, S.B.; LIMA, V.Y.; Anti-Leptospire agglutinins in equine sera, from São Paulo, Goiás and Mato Grosso do Sul, Brazil, 1996-2001. **The Journal of Venomous Animals and Toxins**, v.10, p.207-218, 2004.

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

LEVETT, P.N.; HAAKE, D.A. *Leptospira* species (Leptospirosis) Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases, ed. 7, p. 1-8, 2010.

LILENBAUM, W., Leptospirosis on animal reproduction: IV. Serological findings in mares from six farms in Rio de Janeiro, Brazil (1993-1996). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 35, n.2, p. 61-63, 1998.

MAGALHÃES, D.F.; SILVA, J.A.; MOREIRA, E.C.; WILKE, V.M.L.; HADDAD, J.P.A.; MENESES, J.N.C. Prevalência de aglutininas anti-*Leptospira interrogans* em cães de Belo Horizonte, Minas Gerais, 2001 a 2002. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 2, p. 167-174, 2006.

MCBRIDE, A.J.; ATHANAZIO, D.A.; REIS, M.G.; KO, Al. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 18, p. 376-386, 2005.

MEGID, M.; RIBEIRO, M. G. PAES, A. C. **Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia**. ROCA, 2016.

MONTE, L.G.; JORGE, S.; XAVIER, M.A.; LEAL, F.M.A.; AMARAL, M.G.; SEIXAS, F.K.; DELLAGOSTIN, A.O.; HARTLEBEN, C.P.; Molecular characterization of virulent *Leptospira interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae isolated from *Cavia aperea*. **Acta Tropica**, v. 126, n.2, p. 164-166, 2013.

MORAIS, C.C.G.; KURODA, R.B.S.; PINHO, A.P.V.B.; YWASAKI, F.; MENESES, A.M.C.; MARTINS, A.V.; AMARAL, J.M.; Pesquisa de anticorpos para sorovares de *Leptospira interrogans* patogênicas em equídeos criados na ilha de Algodal, Estado do Pará, **Revista de Ciências Agrárias**, v.53, n.2, p.188-194, Jul/Dez 2010.

NETA, E. I. B.; NETO, J. B.; ARAGÃO, C. P. M.; LEITE, A. K. R. M. Leptospirose em equino: Uma revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 10, p. 841–857, 2016.

OIE. Organização Mundial de Saúde Animal. **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**. 7th Ed. OIE: Paris, 2014. 598 p.

PESCADOR, C.A., CORBELLINI, L.C., LORETTI, A.P., JÚNIOR, E.W., FRANTZ, F.J., DRIEMEIER. Aborto em equino por *Leptospira* sp. *Ciência Rural*, v.34, n.1, p. 271-274, 2004.

PINNA, A. E. Estudo sorológico, bacteriológico e molecular da leptospirose em éguas envolvidas em programa de transferência de embriões. **Tese** (Doutorado) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2011.

PINHEIRO, H.H.; SILVEIRA, W.; OLIVEIRA, V.C. Pesquisas de aglutininas anti-leptospiras em soros equinos abatidos no frigorífico Xavante – Araguari, MG. *Hora Vet.*, v. 5, n. 27, p. 42-44, 1985.

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

POLLE, F.; STOREY, E.; EADES, S.; ALT, D.; HORNSBY, R.; ZUERNER, R.; CARTER, R. Role of intraocular *Leptospira* infections in the pathogenesis of equine recurrent uveitis in the Southern United States. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, p. 1300-1306, 2014.

QUERINO, A.M.V.; DELBEM, Á.C.B.; OLIVEIRA, R.C.; SILVA, F.G.; MÜLLER, E.E.; FREIRE, R.L.; FREITAS, J.C. Fatores de risco associados à leptospirose em cães do município de Londrina-PR. *Semina*. v. 24, n. 1, p. 27-34, 2003.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; HINCHCLIFF, K. W.; CONSTABLE, P. D. **Veterinary Medicine**. 10th ed. London: Elsevier Saunders, 2007. 2156 p.

RIBEIRO, T. M. P. Soroepidemiologia da infecção por *Leptospira* spp. em equinos do município de Rorainópolis, estado de Roraima, Brasil. **Dissertação** (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás. Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ). Goiânia, 2015. 84f.

SANTA ROSA, C.A.; SULZER, C.R.; YANAGUITA, R.M.; SILVA, A.S. Leptospirosis in wildlife in Brazil: Isolation of serovars Canicola, Pyrogenes and Grippotyphosa. **International Journal of Zoonoses**, v. 7, p. 40-43, 1980.

SCHALM, O.W. Clinical significance of plasma protein concentration. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.157, n.11, p.1672-1673, 1970.

SILVA, L. A.; LIMA, K. M. S.; FERNANDES, O. C. C.; BALASSIANO, I. T.; AVELAR, K. E. S.; JESUS, M. S. Seroprevalence of and risk factors for leptospirosis in the City of Manaus, State of Amazonas, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, p. 628-631, 2016.

SMITH, B. P. **Large animal internal medicine**. 5th ed. St. Louis: Elsevier Mosby; 2014. 1872p.

SOUSA, I. K. F.; Leptospirese: epidemiologia da enfermidade em humanos e estudo soroepidemiológico em equinos no estado do Amazonas, **Tese** (Doutorado) - Universidade Federal do Oeste Do Pará, Pará, 2020.

TONIN, A.A.; SILVA, A.S.D.; AZEVEDO, M.I.D.; FRANÇA, R.T.; PAIM, F.C.; SCHAEFER, P.C.; MARTINS, J.L.R.; BADKE, M.R.T.; LOPES, S.T.D.A. Hematologic and biochemical alterations in Wistar rats experimentally infected by *Leptospira interrogans*. **Comparative Clinical Pathology**, v. 21, n. 5, p. 833-838, 2012.

VASYLIEVA, N.; ANDREYCHYN, M.; KRAVCHUK, Y.; CHERVINSKA, O.; IOSYK, I. **Changes in leptospirosis etiology in animals and humans**. *Ann Agric Environ Med.*, v. 24, n. 4, p. 671–675, 2017.

APÊNDICE

FULL ARTICLE



ISSN Online 1678-4456

Frequency of leptospirosis in horses in Manaus and metropolitan region in Amazonas State, Brazil

Frequência de leptospirose em equinos de Manaus e região metropolitana no estado do Amazonas, Brasil

Isadora Karolina Freitas de Sousa^{1,2}; Rebeca Larissa Castro Silva¹; Rejane dos Santos Sousa³; Cláudia Elisa Martins Vieira⁴; Sergio de Melo⁵; Geórgia Portella Quevedo⁵; Ana Eucares Von Laer⁵; Luciane Teresinha Lovato⁵; Alexandre Alberto Tonin^{1,4,5} 

¹ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, Manaus – AM, Brazil

² Universidade Federal do Oeste do Pará, Programa de Pós-graduação em Sociedade, Natureza e Desenvolvimento, Santarém – PA, Brazil

³ Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, Instituto de Estudos do Trópico Úmido, Xinguara, PA – Brazil

⁴ Universidade Federal do Amazonas, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Manaus, AM – Brazil

⁵ Universidade Federal de Santa Maria, Laboratório de Leptospirose, Santa Maria, RS – Brazil

ABSTRACT

The occurrence of leptospirosis is significantly higher in the tropical climate than in temperate regions, especially in periods with high rainfall levels. In horses, leptospirosis can range from subclinical to asymptomatic but maintains an important role in the transmission of leptospirosis by eliminating the agent in the environment. Regarding horses, the Amazonas herd increased by 30% between 2004 and 2013. Thus, the study aimed to determine the serological prevalence of leptospirosis in horses in Manaus and metropolitan regions, in the State of Amazonas, Brazil as well as to assess the main serogroups involved in the infections of these animals. For this purpose, from August 2018 to July 2019, serum from 198 horses was evaluated through the microscopic agglutination test with a panel of 10 serogroups. As a result, 92 horses (44.46%) were found to be positive for one or more *Leptospira* serovars, with the highest prevalence of serogroups Icterohaemorrhagiae and Pyrogenes. Therefore, with the increase in the equine herd in the region and, consequently, greater interaction between breeders and animals, the identification of reagents to at least one serovar of *Leptospira* spp. signals the possible existence of reservoirs of pathogenic strains for other animals and man.

Keywords: Amazonas. Metropolitan region. Epidemiology. Equine. *Leptospira*.

RESUMO

A ocorrência de leptospirose é significativamente maior no clima tropical do que nas regiões temperadas, especialmente em períodos com altos níveis de chuva. Em cavalos, a leptospirose pode variar de subclínica a assintomática, mas estes animais podem desempenhar um papel importante na transmissão da leptospirose por meio da eliminação do agente no ambiente. Em relação aos cavalos, entre os anos de 2004 e 2013, o rebanho Amazônico aumentou 30%. Assim, o objetivo do estudo foi determinar a prevalência sorológica de leptospirose em cavalos em Manaus e região metropolitana, estado do Amazonas, Brasil, bem como, determinar os principais sorogrupos envolvidos nas infecções desses animais. Para este propósito, entre agosto de 2018 e julho de 2019, foram colhidos soros de 198 cavalos para serem avaliados sorologicamente com o teste de microaglutinação microscópica, utilizando-se um painel de dez sorogrupos. Como resultado, observou-se que 92 cavalos (44,46%) foram positivos para um ou mais sorovares de *Leptospira*, com maior prevalência dos sorogrupos Icterohaemorrhagiae e Pyrogenes. Portanto, com o aumento do rebanho equino na região e, conseqüentemente, maior interação entre criadores e animais, a identificação de reagentes para pelo menos um sorovar de *Leptospira* spp. alerta para a possível existência de reservatórios de cepas patogênicas para outros animais e seres humanos.

Palavras-chave: Amazonas. Região metropolitana. Epidemiologia. Equino. *Leptospira*.

Correspondence to:

Alexandre Alberto Tonin
 Universidade Federal de Santa Maria, Laboratório de
 Leptospirose
 Avenida Roraima, 1000, Camobi, Prédio 20, sala 4235
 CEP: 97110-105, Santa Maria – RS, Brazil
 e-mail: alexandre.tonin@ifam.edu.br

Received: July 20, 2020

Approved: September 22, 2020

How to cite: Sousa IKF, Silva RLC, Sousa RS, Vieira CEM, Melo S, Quevedo GP, Von Laer AE, Lovato LT, Tonin AA. Frequency of leptospirosis in horses in Manaus and metropolitan region in Amazonas State, Brazil. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2020;57(4):e172607. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2020.172607>

Introduction

Between the years of 2004 and 2013, the herd of horses in the State of Amazonas increased by 30%, resulting in a herd of 15,479 equines at the end of the evaluated decade. In the same period, growth occurred in all states in the North region of Brazil, with rates between 0.57% in Pará and 98% in Acre. However, this rate differs from traditional states in equine breeding, such as Minas Gerais, Bahia, and São Paulo, which, in the same period, showed a decrease in the effective number of animals in their herds (Brasil, 2016).

The occurrence of leptospirosis is significantly higher in the tropical climate than in temperate regions (such as the Amazonas), mainly due to the higher survival of leptospire in a warm and humid environment, with elevated levels of rainfall and neutral or slightly alkaline soil. These characteristics can result in epidemic outbreaks due to increased exposure to water contaminated with urine or tissues from infected animals (Levett, 2001).

In horses, leptospirosis can be subclinical or asymptomatic, and fever, anorexia, jaundice, uveitis, abortions, or premature births can also be observed (Hong et al., 1993; Hunter & Herr, 1994; Timoney et al., 2011; Yan et al., 2010). Besides, horses have an important role in the transmission of leptospirosis by eliminating the agent in the environment. Even with a high concentration of antibodies in the host, *Leptospira* spp. can survive and multiply in kidney tubules, being eliminated in the urine by the species for at least 30 days post-inoculation or even for 2-3 months (Hamond et al., 2013).

The presence of susceptible animal species in regions with favorable environmental conditions for leptospirosis justifies the need for studies of seroprevalence in human and animal populations (Jesus et al., 2012; Silva et al., 2016).

Besides, there was an increase in the number of horses living in urban areas of Manaus and metropolitan regions, animals that are being used for leisure, work, and sports activities. As a consequence, frequent contact between people and animals, whether in handling, training, or riding therapy sessions, increases the risk of exposure and contamination of humans and other susceptible animals.

In this context, it is essential to know the occurrence of infectious diseases such as leptospirosis, which causes a negative economic impact on equine production systems, such as reproductive losses, and public health risk, due to its zoonotic character. Thus, the present investigation aimed to assess the serological frequency of leptospirosis in horses in Manaus and metropolitan region, in the State of Amazonas, Brazil, as well as to determine the main serogroups involved in the infections of these animals.

Material and Methods**Sampling**

The study was carried out in 17 horse properties located in Manaus, capital of the state of Amazonas, and its metropolitan region, belonging to the North region of Brazil. Our statistical modeling for sampling was performed according to Miot (2011), which is considered a prevalence of 50%, with a confidence level of 95%. There is no predominance of the breed, sex, age, or purpose of use. All animals were studs, raised in a mixed breeding system (at the field during the day and housed at night). The option for not selecting breed, sex, or mean age was to have wider coverage and representative sampling of the location. From August 2018 to July 2019, blood samples were collected from 198 horses by external jugular venipuncture in vacutainer®. None of the animals were ever vaccinated against leptospirosis. For hematological analyses, samples were placed in individual test tubes containing diethylene diamino tetraacetic acid (EDTA), cooled to 4 °C until the analysis was carried out, within a maximum of 12 hours after collection. For serum separation, blood samples (in test tubes without anticoagulant) were centrifuged at 1,000 g x 15 min, followed by aliquotation into individual microtubes and frozen at 20 °C for subsequent serology.

Serologic assay

The serological diagnosis of leptospirosis was carried out in the Leptospirosis Diagnostic Laboratory at the Federal University of Santa Maria (UFSM). Serum samples were tested for anti-*Leptospira* antibodies by microscopic agglutination test (MAT) (Cole et al., 1973;

Galton et al., 1965), using live antigens grown in liquid medium Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) free from contamination or self-agglutination, as recommended by the World Health Organization (2012). A complete panel of ten serogroups (including 13 reference serovars) was used as test antigens, namely: serogroup Sejroe (serovars Hardjo [subtype Hardjo-prajitno] and Wolffi), serogroup Grippotyphosa (serovar Grippotyphosa), serogroup Canicola (serovar Canicola), serogroup Icterohaemorrhagiae (serovars Icterohaemorrhagiae and Copenhageni), serogroup Australis (serovars Australis and Bratislava), serogroup Pomona (serovar Pomona) and serogroup Autumnalis (serovar Butembo), serogroup Pyrogenes (serovar Pyrogenes), serogroup Ballum (serovar Ballum) and serogroup Tarassovi (serovar Tarassovi). Briefly, live suspensions of leptospire representing the 13 serovars were added to serum samples diluted in series in a microtiter plate (96 wells), incubated at room temperature for 2-4 h. The presence or absence of agglutination was examined using dark field microscopy at 100 × magnification. Titers were obtained in a sequence of double dilutions and expressed as the reciprocal of the highest serum dilution that agglutinated at least 50% of leptospire (Cole et al., 1973; Galton et al., 1965).

Hematological analysis

To determine fibrinogen, the thermal precipitation technique described by Schalm (1970) was used, while hematocrit was assessed through the microcentrifugation technique. Based on hematocrit values and fibrinogen concentration, animals were classified as anemic (hematocrit <32%), borderline (hematocrit 32-33%) and non-anemic (hematocrit > 32%), with hyperfibrinogenemia (fibrinogen > 400 g/dL) and normal fibrinogen (fibrinogen <400 g/dL).

Data analysis

The data were analyzed using Excel® 2016 software for the preparation of spreadsheets, being presented with their absolute and relative distribution.

Results

The obtained results demonstrated that from 198 evaluated horses, 92 were positive for one or more *Leptospira* serovars (46.46%). There is a high frequency of animals reacting to serogroups Icterohaemorrhagiae and Pyrogenes, as shown in Table 1. Table 2 brings the results of hematocrit and fibrinogen, where 19 (20.65%) seropositive animals presented anemia, while 14 (15.22%) had borderline hematocrit. Still, 15 (16.30%) of the seropositive animals had hyperfibrinogenemia.

Table 1 – Antibody titers for serogroup and serovars of *Leptospira* spp. in horses in the State of Amazonas, Brazil. Blood collection was performed from August 2018 to July 2019

Serogroup	Serovar	Titration				N. of Animals
		100	200	400	800	
ICT	ICT	35	10	1	-	46
	COP	9	9	1	-	19
PYR	PYR	20	18	5	1	44
BAL	BAL	10	7	2	-	19
TAR	TAR	5	8	3	-	16
CAN	CAN	10	3	1	-	14
AUS	AUS	3	2	-	-	5
	BRA	1	-	-	-	1
SEJ	HAR	-	2	1	-	3
	WOL	1	-	1	-	2
GRI	GRI	1	1	-	-	2
Total		95	60	15	1	-

Obs. AUS: Australis; BAL: Ballum; BRA: Bratislava; CAN: Canicola; COP: Copenhageni; GRI: Grippotyphosa; HAR: Hardjo-prajitno; ICT: Icterohaemorrhagiae; PYR: Pyrogenes; SEJ: Sejroe; TAR: Tarassovi; WOL: Wolffi.

Table 2 – Hematocrit values and fibrinogen assessment of horses with positive serum agglutination and negative values for *Leptospira* spp. in Manaus - AM

Animals	Serum agglutination*	Serum agglutination	Total
	Positive	Negative	
Anemic (<32%)	19	25	44
Borderline (32-33%)	14	18	32
Non-Anemic (≥34%)	59	63	122
Hyperfibrinogenemia	15	17	32
Normal fibrinogen	77	89	166

*Cutoff titer: 100.

Discussion

Research conducted in the last decade in Brazil has shown great variation in the seroprevalence of leptospirosis in horses. The prevalence in the different regions of Brazil varies between 45 and 74.1% (Central West), 8 and 62.5% (Northeast), 79.3 and 100% (North), 17.9 and 71.9% (Southeast), and 60 and 87.1% (South) (Ribeiro, 2015). Of the 198 animals tested, 40 showed positive anti-leptospira agglutinins for only one serovar, 16 for Icterohaemorrhagiae (40%), 15 for Pyrogenes (37.5%), two for Copenhageni (5%), two for Ballum (5%), three for Tarassovi (7.5%) and two for Canicola (5%), while the other positive animals (52) presented coagglutination that could be infection by more than a serovar or crossed reactions between serovars (Levett, 2001). In a study carried out in the state of Pará of the 37 serum samples evaluated, 100% (37/37) showed a reaction against one or more serovars of *Leptospira* spp. Only the Copenhageni serovar did not react with any of the tested samples (Morais et al., 2010).

A survey and serological analysis study carried out with horses in the Rio Grande do Sul (2003) found that in

1,169 analyzed samples, 871 (74.51%) were reactive and 298 (25.49%) did not react with the tested serovars. The most prevalent serovar was: Bratislava (19.92%), followed by Copenhageni (15.06%), (Pires et al., 2005), while in the state of Pernambuco, the analysis of 100 equine sera showed the prevalence of serovars Patoc (35.71%), Butembo (32.14%) and Sentot (14.20%) (Alves et al., 2016). These studies partially corroborate the results reached by Pires et al. (2005), since the serological predominance of serogroup Icterohaemorrhagiae (where it is included the serovar Copenhageni) was observed. However, another main serological result was linked to serogroup Pyrogenes, which is completely different when compared to the other studies mentioned above. This draws attention to the epidemiological variation of leptospirosis across Brazilian territory.

L. interrogans serotype Icterohaemorrhagiae, belonging to Icterohaemorrhagiae serogroup, have synanthropic rodents as their main maintenance host and other non-synanthropic wild animals such as Brazilian guinea pig (Monte et al., 2013) and capybaras (Langoni et al., 2016). The Icterohaemorrhagiae serovar has been described as the most prevalent in horses in several seroepidemiological studies in Brazil, such as Lilenbaum (1998) in the State of Rio de Janeiro; Fávero et al. (2002) in animals from different Brazilian regions; Langoni et al. (2004) in the States of São Paulo, Goiás, and Mato Grosso do Sul; and Hashimoto et al. (2007) in the State of Paraná, which corroborates our results. It is important to emphasize that Icterohaemorrhagiae is the most frequent serovar found in horses and one of the main serovars responsible for the majority of infections in humans observed in tropical urban areas worldwide (Faria et al., 2008). It should be noted that the increase in the occurrence of this serovar can justify the settlement of special practices for rodent control in horse farms (Megid et al., 2016).

Serovar Pyrogenes, belonging to serogroup Pyrogenes, has a low prevalence in horses from other regions of Brazil. However, in Pará State (Morais et al., 2010), as in this study, a high prevalence of Pyrogenes was observed, which may suggest the maintenance of this serovar by other domestic or wild animals living in the Amazon region. The Pyrogenes serovar was isolated for the first time in Brazil from wild mammals (*Nectomys squamipes*) in areas close to São Paulo (Santa Rosa et al., 1980) and later detected in dogs from several states (Aguiar et al., 2007; Magalhães et al., 2006; Querino et al., 2003). In the Amazon region, a serological study of dogs in the municipality of Monte Negro (RO) showed that the Pyrogenes serovar was the second most prevalent in dogs (Aguiar et al., 2007), which may suggest

the transmission of this serovar between dogs and horses in this region.

In addition to participation in the transmission chain, it is important to correlate seroreactivity with clinical signs, or changes in the animals' physiological patterns. In this sense, within the seropositive group (92 animals), 19 presented anemia, with hematocrit between 27-31%, 14 with borderline hematocrit between 32-33%, and 59 animals with normal hematocrit with values ranging from 34-52%. Although the animals' seropositivity for *Leptospira* does not indicate that the animal has an acute clinical picture of the disease, but that at some point in his life he had contact with the bacteria, in the most severe forms, anemia, hyperfibrinogenemia, hemorrhagic petechiae in the mucosa, jaundice, liver damage, hematuria, hemoglobinuria, leukocytosis with neutrophilia or lymphocytosis, azotemia, isotenuria, general depression, neurological signs, renal failure (mainly in foals) and death (Donahue, 1995; Lilenbaum, 1998; Pinheiro et al., 1985; Radostits et al., 2007). Based on this, the presence of anemia and acute-phase protein (fibrinogen) was evaluated to verify the health of the horses studied. Leptospirosis provokes clinical abnormalities that can lead to significant changes in hematological and other laboratory findings. Decreased erythrocyte count, low Hb concentration, PCV, and lymphocytes are common lab findings (Tonin et al., 2012). Leucocytosis, neutrophilia, eosinopenia, and lymphopenia, along with high serum bilirubin concentration have also been reported in equine leptospirosis (Pinna et al., 2010). Laboratory evaluation of animals affected by leptospirosis can reveal hyperfibrinogenemia. Concerning this parameter, among the animals positive for *Leptospira*, 15 had hyperfibrinogenemia, with 60% of the cases having the involvement of serovar Pyrogenes isolated or in coagglutination. Unlike our results, concerning anemia and fibrinogen levels, in a serological study in horses, Farias (2019) showed that there was no difference in the blood count, fibrinogen concentration, and biochemistry between seropositive and seronegative animals for *Leptospira*.

Conclusion

The results obtained in the study indicated a high frequency of seropositivity for *Leptospira* spp. in horses in the state of Amazonas, Brazil, indicating the existence of a high frequency of reaction to serogroups Icterohaemorrhagiae and Pyrogenes. With the increase in the equine herd in the region and, consequently, greater interaction between breeders and animals, the identification of reagents serogroups of

Leptospira spp. signals the possible existence of reservoirs of pathogenic strains for other animals and man.

Conflict of Interest

The authors declare they have no conflicts of interest.

Ethics Statement

The procedures involving animals were approved by the Ethics committee on the use of animals at the Federal Institute of Education, Science, and Technology of Amazonas, under the identification number CEUA.008.02.1417.2404/2020.

References

- Aguiar DM, Cavalcante GT, Marvulo MFV, Silva JCR, Pinter A, Vasconcellos SA, Morais ZM, Labruna MB, Camargo LMA, Gennari SM. Fatores de risco associados à ocorrência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em cães do município de Monte Negro, Rondônia, Amazônia Ocidental Brasileira. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2007;59(1):70. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352007000100012>.
- Alves JRA, Oliveira KDS, Costa DE, Fernandes LG, Higino SSS, Alves CJ, Santos CSAB, Azevedo SS. Caracterização epidemiológica da leptospirose em equinos do estado de Pernambuco, nordeste do Brasil. *Arq Inst Biol.* 2016;83:1-5. <http://dx.doi.org/10.1590/1808-1657001032014>.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Revisão do estudo do complexo do agronegócio do cavalo. Brasília: MAPA; 2016. 54 p.
- Cole JR Jr, Sulzer CR, Pursell AR. Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test. *Appl Microbiol.* 1973;25(6):976-80. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.25.6.976-980.1973>. PMID:4736794.
- Donahue M. Equine leptospirosis. *Equine Dis Quarterl.* 1995;3(4):4-5.
- Faria MT, Calderwood MS, Athanzio DA, McBride AJA, Hartskeerl RA, Pereira MM, Ko AI, Reis MG. Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. *Acta Trop.* 2008;108(1):1-5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.07.005>. PMID:18721789.
- Farias DK. Aspectos soroepidemiológicos e laboratoriais da leptospirose em equinos [tese]. Lages: Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade do Estado de Santa Catarina; 2019.
- Favero ACM, Pinheiro SR, Vasconcellos AS, Morais ZM, Ferreira F, Ferreira Neto JS. Sorovares de leptospirosas predominantes em exames sorológicos de bubalinos, ovinos, caprinos, eqüinos, suínos e cães de diversos estados brasileiros. *Cienc Rur.* 2002;32:613-619. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782002000400011>
- Galton MM, Sulzer CR, Santa Rosa CA, Fields MJ. Application of a microtechnique to the agglutination test for leptospiral antibodies. *Appl Microbiol.* 1965;13(1):81-5. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.13.1.81-85.1965>. PMID:14264852.
- Hamond C, Martins G, Lawson-Ferreira R, Medeiros MA, Lilienbaum W. The role of horses in the transmission of leptospirosis in an urban tropical area. *Epidemiol Infect.* 2013;141(1):33-5. <http://dx.doi.org/10.1017/S0950268812000416>. PMID:22417781.
- Hashimoto VY, Gonçalves DD, Silva FG, Oliveira RC, Alves LA, Reichmann P, Muller EE, Freitas JC. Occurrence of antibodies against *Leptospira* spp. in horses of the urban area of Londrina, Paraná, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2007;49(5):327-30. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652007000500010>. PMID:18026641.
- Hong CB, Donahue JM, Giles JRRC Jr, Petrites-Murphy MB, Poonacha KB, Roberts AW, Smith BJ, Tramontin RR, Tuttle PA, Swerczek TW. Equine abortion and stillbirth in central Kentucky during 1988 and 1989 following seasons. *J Vet Diagn Invest.* 1993;5(4):560-6. <http://dx.doi.org/10.1177/104063879300500410>. PMID:8286455.
- Hunter P, Herr S. Leptospirosis. In: Cortez JAW, Thomson GR, Tustin RC, editors. *Infectious diseases of Livestock*. Oxford: Oxford University; 1994. p. 997-1008.

- Jesus MS, Silva LA, Lima KMS, Fernandes OCC. Cases distribution of leptospirosis in City of Manaus, State of Amazonas, Brazil, 2000-2010. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2012;45(6):713-6. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822012000600011>. PMID:23295874.
- Langoni H, Kuribara IY, Correa APFL, Ullmann LS, Sánchez GP, Lucheis SB. Anti-leptospirosis agglutinins in Brazilian capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2016;22(1):4. <http://dx.doi.org/10.1186/s40409-016-0059-6>. PMID:26819575.
- Langoni H, Silva AV, Pezerico SB, Lima VY. Anti-Leptospire agglutinins in equine sera, from São Paulo, Goiás and Mato Grosso do Sul, Brazil, 1996-2001. *J Venom Anim Toxins*. 2004;10(3):207-18. <http://dx.doi.org/10.1590/S1678-91992004000300003>.
- Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14(2):296-326. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.14.2.296-326.2001>. PMID:11292640.
- Lilenbaum W. Leptospirosis on animal reproduction: IV. Serological findings in mares from six farms in Rio de Janeiro, Brazil (1993-1996). *Braz J Vet Res Anim Sci*. 1998;35(2):61-3. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-95961998000200002>.
- Magalhães DF, Silva JA, Moreira EC, Wilke VML, Haddad JPA, Meneses JNC. Prevalência de aglutininas anti-*Leptospira interrogans* em cães de Belo Horizonte, Minas Gerais, 2001 a 2002. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2006;58(2):167-74. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352006000200004>.
- Megid M, Ribeiro MG, Paes AC. Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia. Rio de Janeiro: Roca; 2016.
- Miot HA. Tamanho da amostra em estudos clínicos e experimentais. *J Vasc Bras*. 2011;10(4):275-8. <http://dx.doi.org/10.1590/S1677-54492011000400001>.
- Monte LG, Jorge S, Xavier MA, Leal FMA, Amaral MG, Seixas FK, Dellagostin AO, Hartleben CP. Molecular characterization of virulent *Leptospira interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae isolated from *Cavia aperea*. *Acta Trop*. 2013;126(2):164-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.02.009>. PMID:23435256.
- Morais CCG, Kuroda RBS, Pinho APVB, Ywasaki F, Meneses AMC, Martins AV, Amaral JM Jr. Pesquisa de anticorpos para sorovares de *Leptospira interrogans* patogênicas em equídeos criados na ilha de Algodual, Estado do Pará. *Rev Cienc Agrária*. 2010;53(2):188-94. <http://dx.doi.org/10.4322/rca.2011.027>.
- Pinheiro HH, Silveira W, Oliveira VC. Pesquisas de aglutininas anti- leptospirosas em soros eqüinos abatidos no frigorífico Xavante – Araguari, MG. *Hora Vet*. 1985;5(27):42-4.
- Pinna M, Martins G, Freire I, Lilenbaum W. Seropositivity to *Leptospira interrogans* serovar Bratislava associated to reproductive problems without significant biochemical or hematological alterations in horses. *Cienc Rural*. 2010;40(10):2214-7. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782010005000178>.
- Pires JAS No, Hesse F, Oliveira MAM. Leptospirose eqüina: aspectos clínicos, tratamento, prevenção e levantamento sorológico. *Vet Foco*. 2005;2(2):165.
- Querino AMV, Delbem ÁCB, Oliveira RC, Silva FG, Müller EE, Freire RL, Freitas JC. Fatores de risco associados à leptospirose em cães do município de Londrina-PR. *Semina*. 2003;24(1):27-34. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2003v24n1p27>.
- Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD. *Veterinary medicine*. 10th ed. London: Elsevier Saunders; 2007. 2156 p.
- Ribeiro TMP. Soroepidemiologia da infecção por *Leptospira* spp. em equinos do município de Rorainópolis, estado de Roraima, Brasil [dissertação]. Goiânia: Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás; 2015.
- Santa Rosa CA, Sulzer CR, Yanaguita RM, Silva AS. Leptospirosis in wildlife in Brazil: Isolation of serovars Canicola, Pyrogenes and Grippotyphosa. *Int J Zoonoses*. 1980;7:40-3.
- Schalm OW. Clinical significance of plasma protein concentration. *J Am Vet Med Assoc*. 1970;157(11):1672-3. PMID:5530370.
- Silva LA, Lima KMS, Fernandes OCC, Balassiano IT, Avelar KE, Jesus MS. Seroprevalence of and risk factors for leptospirosis in the City of Manaus, State of Amazonas, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016;49(5):628-31. <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0115-2016>. PMID:27812660.
- Timoney JF, Kalimthusamy N, Velineni S, Donahue JM, Artiushin SC, Fetting M. A unique genotype of *Leptospira interrogans* serovar Pomona type Kennewicki is

associated with equine abortion. *Vet Microbiol.* 2011;150(3-4):349-53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.02.049>. PMID:21450416.

Tonin AA, Silva ASD, Azevedo MID, França RT, Paim FC, Schaefer PC, Martins JLR, Badke MRT, Lopes STDA. Hematologic and biochemical alterations in Wistar rats experimentally infected by *Leptospira interrogans*. *Comp Clin Pathol.* 2012;21(5):833-8. <http://dx.doi.org/10.1007/s00580-011-1186-7>.

World Health Organization – WHO. Leptospirosis [Internet]. Geneva: WHO; 2012 [cited 2020 July 20]. Available

from: http://www.wpro.who.int/mediacentre/factsheets/fs_13082012_leptospirosis/en/

Yan W, Faisal SM, Divers T, McDonough SP, Akey B, Chang YF. Experimental *Leptospira interrogans* sorovar Kennewicki infection of horses. *J Vet Intern Med.* 2010;24(4):912-7. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.00507.x>. PMID:20649749.

Financial Support: Funding to conduct the study was provided by IFAM by Scientific Development and Technological Innovation Support Program (PADCIT) - Edict No. 001/2018/PR-PPGI/IFAM.