



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

A LEPTOSPIROSE BOVINA

Guillaume Jacques Alain RIVIÈRE

Coimbra, Julho de 2023



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

A LEPTOSPIROSE BOVINA

Coimbra, Julho de 2023

Guillaume Jacques Alain RIVIÈRE

Aluno do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Constituição do Júri

Presidente do Júri: Professor Doutor Sérgio
Eduardo Ramalho de Sousa

Arguente: Professora Doutora Sofia Ferreira
Anastácio

Orientador : Professora Doutora Maria Inês Alves
de Carvalho Martins Carolino

Orientador Interno

Professora Doutora Maria Inês Carolino

Coorientador Interno

Professora Doutora Gisele Margatho

Dissertação do Estágio Curricular do Ciclo de Estudos
Conducente ao Grau de Mestre em Medicina Veterinária da EUVG

ÍNDICE GERAL

RESUMO/ABSTRACT	2
INTRODUÇÃO	3
I. Agente etiológico	4
A. Taxonomia	4
1. Classificação serológica	4
2. Classificação genotípica	5
3. Classificação genómica	8
B. Características morfológicas	11
C. Metabolismo	12
II. Epidemiologia	13
A. Distribuição	13
B. Hospedeiros	16
C. Fontes de infecção	17
D. Modos de transmissão	17
E. Papel do ambiente na transmissão de leptospiros	18
III. Etapas da infecção	20
A. Fase de contaminação	20
B. Fase de leptospiremia	20
C. Fase imunitária	21
IV. Manifestações clínicas	22
A. Formas hiperagudas	23
B. Formas agudas	23
C. Formas crónicas	24
V. Diagnóstico	25
A. Suspeita clínica	25
B. Análises bioquímicas e hematológicas	26
C. Exames complementares	26
1. Métodos de diagnóstico direto	27
a. Microscópio ótico e cultura	28
b. Técnicas de colorações imunoquímicas	30
c. Métodos moleculares	30
2. Métodos de diagnóstico indireto	31
a. Teste de micro-aglutinação (MAT)	31
b. Dosagem imuno-enzimática (ELISA)	33

D. Necrópsia.....	33
VI. Tratamento.....	35
A. Antibioterapia.....	35
B. Tratamento sintomático.....	36
VII. Profilaxia.....	36
A. Profilaxia médica.....	37
B. Metafilaxia.....	38
C. Profilaxia sanitária.....	38
CONCLUSÃO.....	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 : Árvore filogenética baseada nas sequências dos genomas de 90 estirpes de <i>Leptospira</i>	10
Figura 2 : Esquema representativo da dupla membrana de <i>L. interrogans</i>	11
Figura 3 : Morfologia e formas de movimento de <i>L. interrogans</i>	12
Figura 4 : Esquema representativo das origens geográficas das espécies patogênicas de <i>Leptospira</i> mais frequentemente encontradas.....	13
Figura 5 : Esquema do ciclo de transmissão da leptospirose.....	18
Figura 6 : Mecanismos hipotéticos da sobrevivência e da disseminação das leptospirosas durante os episódios de chuvas importantes.....	19
Figura 7 : Representação das fases de contaminação e de difusão hematogênica das leptospirosas.....	21
Figura 8 : Diferenças entre técnicas de laboratório utilizadas no diagnóstico da leptospirose em função da cronologia da doença.....	27

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 : Número de animais testados consoante o serogrupo, com a representação da percentagem de soros positivos em função dos soros testados de cada uma espécie.....	14
Gráfico 2 : Serogrupo dominante nos bovino infectados consoante o ano.....	14
Gráfico 3 : Distribuição dos serogrupos de <i>Leptospira</i> dentro dos 394 rebanhos de bovinos suspeitados de leptospirose.....	15
Gráfico 4 : Distribuição espacial dos serogrupos infectantes para os 394 rebanhos de bovinos testados consoante às regiões francesas.....	15

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 : Serogrupos e alguns serovares de <i>L. interrogans</i> sensu lato.....	5
Tabela 2 : Alguns exemplos de genomospecies e as suas distribuições nos serogrupos.....	6
Tabela 3 : Algumas genomospecies associadas ao serogrupo.....	7
Tabela 4 : Classificação molecular das espécies de <i>Leptospira</i>	9

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS

ALP : Fosfatase alcalina
ALT : Alanina aminotransferase
AST : Aspartato aminotransferase
BGL : Bovine Genital Leptospirosis
BSA : Albumina sérica bovina
BVD : Diarreia bovina viral
CAAT : Teste de absorção por aglutinação cruzada
CIVD : Coagulação intravascular disseminada
CMI : Concentração minimal inibitória
DNA : Ácido desoxirribonucleico
ELISA : Dosagem imuno-enzimática
EMJH : Ellinghausen McCullough Johnson e Harris
GGT : Gama glutamil transferase
IBR : Rinotraqueíte bovina infecciosa
IgM : Imunoglobulina M
IgG : Imunoglobulina G
IM : Intramuscular
IV : Intravenosa
LAT : Teste de aglutinação ao latex
LCR : Líquido cefalo-raquidiano
LFA : Teste de fluxo lateral
LigA : Proteína A de tipo imunoglobulina
LigB : Proteína B de tipo imunoglobulina
LipL21 : Lipoproteína L21
LipL32 : Lipoproteína L32
LipL41 : Lipoproteína L41
LPS : Lipopolissacarídeo
LTM : Leptospira Transport Medium
MAT : Teste de aglutinação microscópica
MEC : Matriz extracelular
PCR : Reação em cadeia por polimerase
PRR : Pattern Recognition Receptors
RNAr : Ácido ribonucleico ribossomal
ROS : Espécies reativas do oxigénio
SC : Subcutânea
UV : Ultravioletas

A LEPTOSPIROSE BOVINA

Guillaume Rivière^a, Gisele Margatho^b, Inês Carolino^a

^a Departamento de Medicina Veterinária, Escola Universitária Vasco da Gama, Av. José R. Sousa Fernandes 197, Campus Universitário- Bloco B, Lordemão, 3020-210, Coimbra, Portugal (riviereguyllaume51@gmail.com; maria.carolino@euvg.pt)

^b CESPU - Cooperativa de Ensino Superior Politécnico e Universitário, CRL, Campus Universitário de Gandra: Avenida Central de Gandra, 1317, 4585-116 Gandra PRD, Portugal (giselemargatho@gmail.com)

RESUMO

A leptospirose é uma doença zoonótica com uma distribuição mundial que pode afectar a maioria dos mamíferos. A doença é causada pela bactéria do género *Leptospira*, existindo mais de 60 espécies e 300 serovares. A leptospirose bovina é provocada principalmente pela infecção pelo serovar Hardjo, apesar de numerosos serovares poderem infetar e causar leptospirose nos bovinos. A forma crónica da doença é a principal forma da doença nos bovinos, responsável por importantes perdas económicas, provocando falhas reprodutivas, nomeadamente abortos, infertilidade e mortinatalidade. As leptospirosas podem ser isoladas dos rins e do trato reprodutor dos animais infetados e a transmissão pode ocorrer por contacto directo com animais infetados ou indirectamente através do ambiente contaminado. O diagnóstico clínico é geralmente difícil, pois os animais manifestam poucos sinais clínicos e geralmente são inespecíficos. O diagnóstico laboratorial é laborioso pela dificuldade em cultivar e isolar as bactérias. O teste de micro-aglutinação (MAT) é o teste serológico de referência mas a sua interpretação é difícil, principalmente na fase crónica da doença. O controlo da leptospirose é baseado na gestão do meio ambiental, na vacinação e na implementação duma antibioterapia com objectivo da cura bacteriológica, da diminuição do risco de transmissão dentro do rebanho e da diminuição das perdas devido a falhas reprodutivas.

PALAVRAS-CHAVE : leptospirose, aborto, MAT, vacinação

ABSTRACT

Leptospirosis is a zoonotic disease with a global distribution that affects most mammals. The disease is caused by bacteria to genus of *Leptospira*, with more than 60 species and 300 serovars. Bovine leptospirosis is caused mainly by infection with serovar Hardjo, but numerous serovars can affect and cause leptospirosis in cattle. The chronic form of the disease is the most frequent presentation in cattle, responsible for important economic losses, causing reproductive failures, mainly abortion, sterility and stillbirth. Leptospirae can be isolated from the kidneys and reproductive tract of infected animals and transmission can occur through direct contact with infected animals or indirectly through contaminated environment. The clinical diagnosis is generally difficult, because the animals express few clinical signs, which are generally nonspecific. Laboratory diagnosis is laborious due to the difficulty in cultivating and isolating bacteria. The microagglutination test (MAT) is the serological test, but its interpretation is difficult, especially in the chronic phase of the disease. Leptospirosis control is based on environmental management, vaccination and the implementation of antibiotherapy with the aim of a bacteriological cure, a reduction in the risk of transmission within the herd and a reduction in losses due to reproductive failures.

KEY-WORDS : leptospirosis, abortion, MAT, vaccination

INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença infecciosa zoonótica de distribuição mundial, causada por uma espiroqueta patogénica do género *Leptospira*. Esta doença é endémica em alguns países desenvolvidos e nos países em desenvolvimento, e é considerada como emergente ou re-emergente em vários países sub-desenvolvidos, com maior incidência da doença observa-se nos países pobres e nas regiões tropicais. Foi estimado que um milhão de casos são reportados no mundo e que a doença é responsável pela morte de 60 000 pessoas por ano (Costa 2015).

A leptospirose bovina foi descrita em 1937 (Camart-Périé *et al.* 2012) e está presente no mundo inteiro. Os bovinos podem ser infectados por uma grande variedade de espécies de *Leptospira* e serovares. O serovar mais frequentemente encontrado é o serovar Hardjo, pertencendo ao serogrupo Serjoe, e consiste em duas estirpes serologicamente idênticas mas geneticamente diferentes : *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo tipo bovis, e *Leptospira interrogans* serovar Hardjo tipo prajitno. Os bovinos são considerados hospedeiros de manutenção deste serovar, mas podem ser infectados também por outros serovares, designadas de infeções acidentais. A transmissão das leptospirosas ocorre por contacto directo com animais infectados ou indirectamente pelo ambiente, alimentos ou água contaminados com urina infectada. A doença é responsável por perdas económicas importantes, manifestando-se por diminuição da produção leiteira e por falhas reprodutivas, nomeadamente abortos, infertilidade e nados mortos. Os bovinos infectados podem desenvolver uma variedade de sinais clínicos, a maioria das infeções sendo assintomáticas, no entanto, os bovinos infectados podem desenvolver uma doença aguda potencialmente fatal, maioritariamente nas infeções acidentais. As leptospirosas podem persistir nos túbulos contornados renais próximos dos animais infectados e ser excretadas de forma intermitente para o ambiente com a urina, no qual podem sobreviver e ficar infecciosas durante longos períodos. O diagnóstico pode ser efetuado pela observação direta das leptospirosas, cultura ou detecção de DNA, ou indirectamente pela detecção de anticorpos específicos. A principal dificuldade reside na identificação dos animais portadores crónicos responsável pela contaminação do ambiente e pela infecção dos animais. O controlo da doença é determinante para diminuir os riscos de infecção e de desenvolvimento da doença, o qual inclui antibioterapia, imunização dos animais pela vacinação e medidas de biossegurança.

O objectivo deste trabalho é abordar a leptospirose bovina quanto à epidemiologia e transmissão, as várias manifestações clínicas e métodos de diagnósticos, bem como dos tratamentos e métodos de prevenção.

I. AGENTE ETIOLÓGICO

As bactérias responsáveis pela leptospirose pertencentes ao género *Leptospira*, à família Leptospiraceae, Ordem Leptospirales, Classe Spirochaetia, Filo Spirochaetota, Sub-reino Negibacteria e Reino Bacteria (Arent *et al.* 2022). Historicamente, duas classificações foram utilizadas para caracterizar a *Leptospira* spp., uma baseada em critérios serológicos, e uma outra utilizando técnicas moleculares para identificar as espécies ou genomaspecies (Guernier *et al.* 2018).

A. TAXONOMIA

1. CLASSIFICAÇÃO SEROLÓGICA

Antes de 1989, o género *Leptospira* foi dividido em duas espécies, *Leptospira interrogans*, incluindo todas as estirpes patogénicas, e *Leptospira biflexa*, contendo todas as estirpes sapróficas isoladas do ambiente. *L. biflexa* foi diferenciada de *L. interrogans* pela sua capacidade de se desenvolver a uma temperatura de 13°C e ao contacto de 8-azaguanina numa concentração de 225 µg/mL (Levett 2001). Dentro destas duas espécies, as leptospiros foram agrupadas em serovares, de acordo com os resultados obtidos pelo MAT e o teste de absorção por aglutinação cruzada (CAAT) com antígenos homólogos (Guernier *et al.* 2018). Foi definido que duas estirpes são consideradas pertencentes a diferentes serovares se, após a absorção cruzada com quantidade adequadas de antígeno heterólogo, 10% ou mais do título homólogo permanece em pelo menos um dos dois anti-soros em testes repetidos. Assim, as leptospiros foram classificadas serologicamente em 300 serovares, baseadas na semelhança dos epítomos expostos à superfície, determinados por lipopolissacarídeos (Arent *et al.* 2022). Além disso, os serovares antigenicamente próximos foram agrupados em serogrupos, e hoje existem 30 serogrupos diferentes (Tabela 1).

Tabela 1 : Serogrupos e alguns serovares de *L. interrogans* sensu lato (Levett 2001).

Serogrupo	Serovar(es)
Icterohaemorrhagiae	icterohaemorrhagiae, copenhageni, lai,
Hebdomadis	hebdomadis, jules, kremastos
Autumnalis	autumnalis, fortbragg, bim, weerasinghe
Pyrogenes	pyrogenes
Bataviae	bataviae
Grippotyphosa	grippotyphosa, canalzonae, ratnapura
Canicola	canicola
Australis	australis, bratislava, lora
Pomona	pomona
Javanica	javanica
Serjoe	serjoe, hardjo, saxkoebing
Panama	panama, mangus
Cynopteri	cynopteri
Djasiman	djasiman
Sarmin	sarmin
Mini	mini, georgia
Tarassovi	tarassovi
Ballum	ballum, aroborea
Celledoni	celledoni
Louisiana	louisiana, lanka
Ranarum	ranarum
Manhao	manhao
Shermani	shermani
Hurstbridge	hurstbridge

2. CLASSIFICAÇÃO GENOTÍPICA

Com o avanço da biologia molecular conhecem-se atualmente muitas novas espécies de leptospiros. A heterogeneidade genética foi demonstrada por técnicas de hibridização DNA-DNA que permitiram identificar várias genomospecies ao longo dos anos. No fim da década 1990, 10 genomospecies foram identificadas : *L. interrogans*, *L. biflexa*, *Leptospira parva*, *Leptospira borgpetersenii*, *Leptospira inadai*, *Leptospira noguchii*, *Leptospira santarosai*, *Leptospira weilii*, *Leptospira wolbachii* e *Leptospira meyeri* (Yasuda et

al. 1987). Nos anos seguintes, várias espécies foram descobertas, como *Leptospira kirschneri* (Ramadass 1992), *Leptospira fanei* (Perolat et al. 1998), *Leptospira alexanderi* (Brenner et al. 1999), *Leptospira broomii* (Levett et al. 2006), *Leptospira licherasiae* (Matthias et al. 2008), *Leptospira wolffii* (Slack et al. 2008), *Leptospira kmetyi* (Slack et al. 2009), *Leptospira idonii* (Saito et al. 2013), *Leptospira alstoni*, *Leptospira vanthiellii*, *Leptospira terpstrae*, *Leptospira yanagawae* (Smythe et al. 2013) e *Leptospira mayottensis* (Bourhy et al. 2014). No entanto, a proximidade das estirpes revelada pelos testes serológicos que permitiu definir os serogrupos, não refletiu obrigatoriamente uma proximidade genómica. Assim, os serovares pertencentes ao mesmo serogrupo podem ser dispersados por várias genomospecies (Tabela 2), e numa mesma genomospecies, pode encontrar-se vários serogrupos (Tabela 3).

Tabela 2 : Alguns exemplos de genomospecies e as suas distribuições nos serogrupos (Levett 2001).

Genomospecies	Serogrupos
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae, Canicola, Pomona, Australis, Autumnalis, Pyrogenes, Grippotyphosa, Djasiman, Hebdomadis, Sejroe, Bataviae, Ranarum, Louisiana, Mini, Sarmin
<i>L. noguchii</i>	Panama, Autumnalis, Pyrogenes, Louisiana, Bataviae, Tarassovi, Australis, Shermani, Djasiman, Pomona
<i>L. santarosai</i>	Shermani, Hebdomadis, Tarassovi, Pyrogenes, Autumnalis, Bataviae, Mini, Grippotyphosa, Sejroe, Pomona, Javanica, Sarmin, Cynopteri
<i>L. meyeri</i>	Ranarum, Semarang, Sejroe, Mini, Javanica
<i>L. wolbachii</i>	Codice
<i>L. biflexa</i>	Semarang, Andamana
<i>L. fanei</i>	Hurstbridge
<i>L. borgpetersenii</i>	Javanica, Ballum, Hebdomadis, Sejroe, Tarassovi, Mini, Celledoni, Pyrogenes, Bataviae, Australis, Autumnalis
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa, Autumnalis, Cynopteri, Hebdomadis, Australis, Pomona, Djasiman, Canicola, Icterohaemorrhagiae, Bataviae
<i>L. weilii</i>	Celledoni, Icterohaemorrhagiae, Sarmin, Javanica, Mini, Tarassovi, Hebdomadis, Pyrogenes, Manhao, Sejroe
<i>L. inadai</i>	Lyme, Shermani, Icterohaemorrhagiae, Tarassovi, Manhao, Canicola, Panama, Javanica
<i>L. alexanderi</i>	Manhao, Hebdomadis, Javanica, Mini,

Tabela 3 : Algumas genomospecies associadas ao serogrupo (Levett 2001).

Serogrupo	Genomospecies
Andamana	<i>L. biflexa</i>
Australis	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. kirschneri</i>
Autumnalis	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. kirschneri</i>
Ballum	<i>L. borgpetersenii</i>
Bataviae	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. kirschneri</i>
Canicola	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. kirschneri</i>
Celledoni	<i>L. weilii</i> , <i>L. borgpetersenii</i>
Codice	<i>L. wolbachii</i>
Cynopteri	<i>L. santarosai</i> , <i>L. kirschneri</i>
Djasiman	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. kirschneri</i>
Grippotyphosa	<i>L. interrogans</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. kirschneri</i>
Hebdomalis	<i>L. interrogans</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. kirschneri</i> , <i>L. alexanderi</i>
Hurstbridge	<i>L. fainei</i>
Icterohaemorrhagiae	<i>L. interrogans</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. inadaï</i> , <i>L. kirschneri</i>
Javanica	<i>L. weilii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. meyeri</i> , <i>L. inadaï</i> , <i>L. alexanderi</i>
Louisiana	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i>
Lyme	<i>L. inadaï</i>
Manhao	<i>L. weilii</i> , <i>L. inadaï</i> , <i>L. alexanderi</i>
Mini	<i>L. interrogans</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. meyeri</i> , <i>L. alexanderi</i>
Panama	<i>L. noguchii</i> , <i>L. inadaï</i>
Pomona	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. kirschneri</i>
Pyrogenes	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i>
Ranarum	<i>L. interrogans</i> , <i>L. meyeri</i>
Sarmin	<i>L. interrogans</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. santarosai</i>
Serjoe	<i>L. interrogans</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. meyeri</i>
Semaranga	<i>L. meyeri</i> , <i>L. biflexa</i>
Shermani	<i>L. noguchii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. inadaï</i>
Tarassovi	<i>L. noguchii</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. inadaï</i>

Ao contrário da classificação genotípica, a classificação serológica não é correta dum ponto de vista taxonómico, mas é utilizada pelos clínicos e epidemiologistas por ajudar na compreensão dos mecanismos patológicos e da resposta imunológica, bem como no diagnóstico e na imunização vacinal específica (Arent *et al.* 2022). Por outro lado, as espécies *L. interrogans* e *L. biflexa* na classificação serológica são também genomospecies na classificação genotípica. Por esta razão, a terminação « *sensu lato* » é aplicada para definir as espécies da classificação serológica, e a terminação « *sensu stricto* » para as da classificação genotípica. Igualmente, as características anteriormente utilizadas para distinguir *L. interrogans sensu lato* e *L. biflexa sensu lato* não são aplicáveis para distinguir as genomospecies (Brenner *et al.* 1999).

3. CLASSIFICAÇÃO GENÓMICA

Os métodos de hibridização DNA-DNA foram complementados posteriormente por outros métodos moleculares, consistindo na análise e na comparação das sequências de marcadores DNA, nomeadamente a sequência do gene 16S rRNA. Essas análises filogenéticas permitiram dividir o género em três clados (Lehman *et al.* 2014), consoante o seu nível de patogenicidade, nos quais são agrupados várias espécies (Puche *et al.* 2018) (Tabela 4) :

- espécies patogénicas, definidas como capazes de infectar e causar doença nos humanos e animais, incluindo *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. noguchii*, *L. weilii*, *L. alexanderi*, *L. kmetyi*, *L. alstoni* e *L. mayottensis* ;
- espécies intermediárias, isoladas a partir de amostras de humanos e animais, e cuja a patogenicidade não foi demonstrada experimentalmente : *L. inadai*, *L. broomii*, *L. fainei*, *L. wolffii*, *L. venezuelensis* e *L. licerasiae* ;
- espécies sapróficas, aquelas que se encontram no ambiente e não responsáveis por causar doença : *L. biflexa*, *L. idonii*, *L. wolbachii*, *L. meyeri*, *L. vanthielii*, *L. terpstrae* e *L. yanagawae*.

Tabela 4 : Classificação molecular das espécies de *Leptospira* (adaptado de Thibeaux *et al.* 2018).

Espécies de <i>Leptospira</i>		
Espécies Patogénicas	Espécies Intermediárias	Espécies Saprófitas
<i>L. interrogans</i>	<i>L. inadai</i>	<i>L. biflexa</i>
<i>L. kirschneri</i>	<i>L. broomii</i>	<i>L. wolbachii</i>
<i>L. borgpetersenii</i>	<i>L. fainei</i>	<i>L. meyeri</i>
<i>L. santarosai</i>	<i>L. wolffii</i>	<i>L. vanthielii</i>
<i>L. noguchii</i>	<i>L. licerasiae</i>	<i>L. terpstrae</i>
<i>L. weilii</i>	<i>L. venezuelensis</i>	<i>L. yanagawae</i>
<i>L. alexanderi</i>		<i>L. idonii</i>
<i>L. kmetyi</i>		
<i>L. alstoni</i>		
<i>L. mayottensis</i>		

No entanto, a análise da sequência do gene 16S rRNA apresentou inconvenientes por ter uma resolução taxonómica limitada (Arent *et al.* 2022). Para compensar esta característica, foram realizadas análises do genoma completo por várias técnicas utilizando diferentes isolamentos provenientes de várias partes do mundo, que permitiram aferir as informações já obtidas. Em 2018, 12 novas espécies de *Leptospira* foram identificadas, somando no total de 35 o número de espécies conhecidas (Thibeaux *et al.* 2018), e em 2019, Vincent *et al.* (2019) demonstrou a existência de 64 espécies de *Leptospira*, das quais 30 foram identificadas como novas. Dentro destas 30 novas espécies, 4 foram classificadas como patogénicas, 10 como intermediárias e 16 como sapróficas (Vincent *et al.* 2019). Os resultados obtidos durante este estudo defendeu a existência de dois clados e quatro sub-clados (Figura 1) :

- Clado saprófita, incluído as espécies isoladas a partir do ambiente natural e não responsáveis por causar infecção
 - Sub-clado S1 representando o grupo saprófita ;
 - Sub-clado S2 representando uma nova classificação ;

- Clado patogénica, contendo todas as espécies para as quais o estatuto virulência foi demonstrado e comprovado
 - Sub-clado P1 correspondendo ao grupo patogénico ;
 - Sub-clado P2 correspondendo ao grupo intermediário.

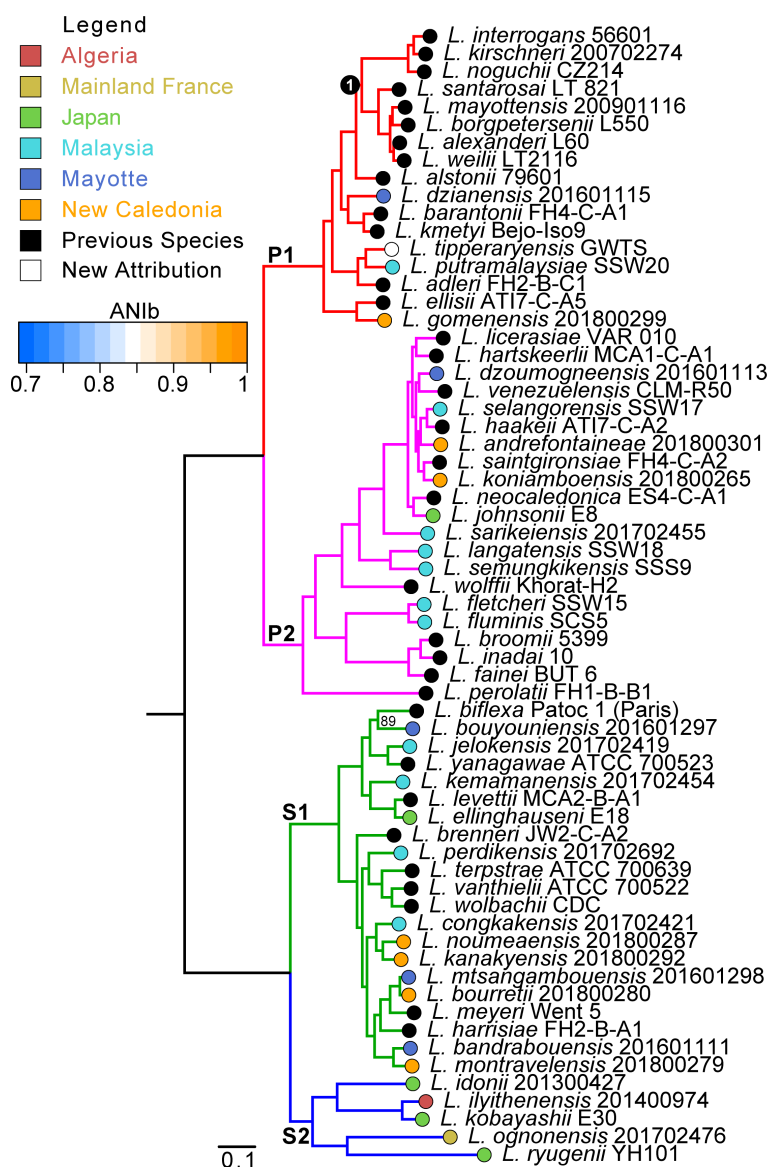


Figura 1 : Árvore filogenética baseada nas sequências dos genomas de 90 estirpes de *Leptospira*. Os ramos são corados de acordo com a sua pertença aos quatro sub-clados principais : P1 (vermelho), P2 (roxo), S1 (verde) et S2 (azul). Conforme a legenda, a cor do círculo representa a origem geográfica de cada uma das novas espécies descritas no estudo (Vincent et al 2019).

B. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

As leptospiros patogénicas e saprófitas são morfologicamente indistinguíveis. Independentemente da espécie, são bactérias finas, móveis e enroladas em forma de espiral. Medem 6 a 20 μm de comprimento por 0,1 μm de diâmetro, e possuem extremidades em forma de gancho (Levett 2001). Como todas as espiroquetas, apresentam uma dupla membrana, constituída por uma membrana citoplasmática, intimamente associada à parede celular do peptidoglicano localizado no espaço periplásmico, e são revestidas por uma membrana externa rica em proteínas e lipopolissacarídeos (LPS) (Figura 2). As leptospiros patogénicas e saprófitas partilham então características das bactérias Gram + e Gram- (Evangelista *et al.* 2010).

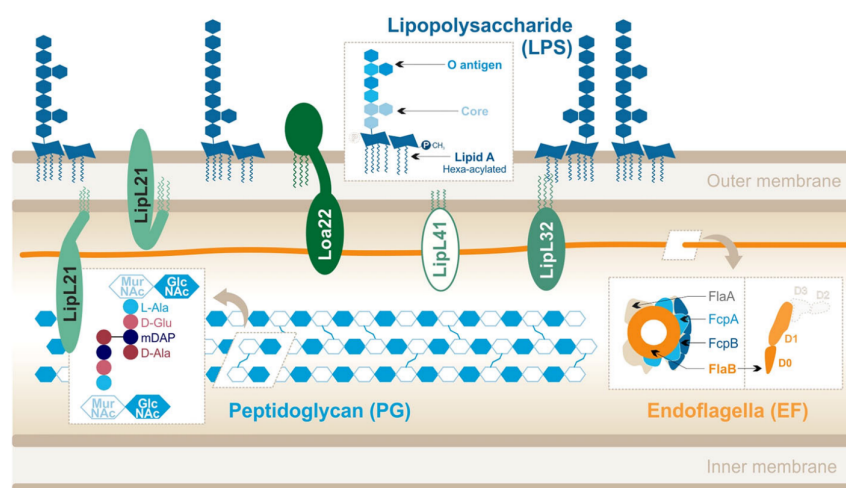


Figura 2 : Esquema representativo da dupla membrana de *L. interrogans* (Bonhomme *et al.* 2020).

A motilidade das leptospiros é conferida por dois flagelos periplásmicos, ou endoflagelos, inseridos em posição sub-terminal de cada uma das extremidades da célula e que se estendem para o seu interior. Apresentam uma forma enrolada que confere um aspecto encurvado ao nível das extremidades da célula. A rotação destes endoflagelos permite por sua vez, rodar o corpo celular enrolado, ou cilindro protoplasmático, permitindo à bactéria deslocar-se no seu meio (Xu *et al.* 2020). Este tipo de deslocamento chama-se « swimming » (Nakamura 2022). A morfologia da extremidade da célula está definida pelo sentido de rotação dos flagelos. A rotação no sentido anti-horário confere uma forma de espiral às extremidades, enquanto a rotação no sentido horário dá uma forma em gancho (Fontana *et al.* 2016). A inversão do sentido de rotação dos flagelos permite à célula mudar de direcção. A forma assimétrica da bactéria permite-lhe propulsar-se de maneira

unidirecional, e as extremidades anterior e posterior apresentam uma forma em espiral e em gancho respectivamente (Nakamura 2022) (Figura 3).

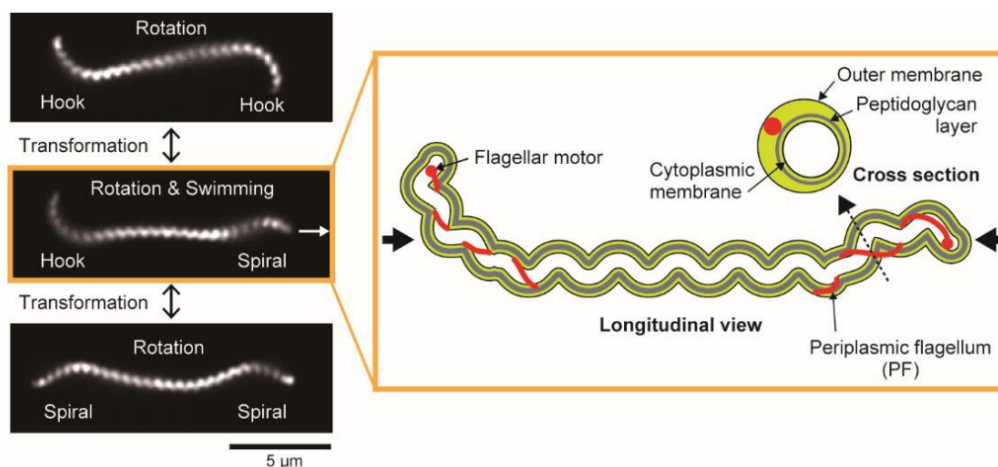


Figura 3 : Morfologia e formas de movimento de *L. interrogans* (Nakamura 2022).

C. METABOLISMO

As leptospiros são bactérias aeróbias obrigatórias, com uma temperatura de crescimento ótima entre 28 e 30°C (Levett 2001). Preferem um ambiente quente e húmido, com um pH entre 7,2 e 8,0. Toleram portanto melhor os meios alcalinos, nos quais podem sobreviver durante longos períodos (Guedes *et al.* 2020). A sobrevivência das bactérias é curta em condições de ambiente seco ou em temperaturas inferiores à 10°C, e temperaturas negativas são fatais (Callan 2015). Também, são bactérias muito sensíveis às radiações do espectro ultravioleta (UV) e necessitam de ambientes protegidos da luz para se desenvolverem. Do ponto de vista metabólico, as leptospiros utilizam como fonte de carbono e de energia os ácidos gordos de cadeia longa por β -oxidação. Os açúcares e os aminoácidos não são indispensáveis para o seu metabolismo, e o ião amónio constitui a única fonte de azoto que utilizam. Algumas vitaminas, como a vitamina B₁ e B₁₂, bem como o ferro na forma ferrosos são factores de crescimento indispensáveis (Legrand 2007). Relativamente à actividade enzimática das leptospiros, elas sintetizam uma catalase e uma oxidase (Levett 2001).

II. Epidemiologia

A. Distribuição

A leptospirose é uma doença de distribuição mundial no mundo (Figura 4). É mais frequentemente em regiões tropicais do que em regiões temperadas, e apresenta uma ocorrência sazonal, com pico de incidência no fim de verão e no início de outono nas regiões temperadas e, durante a estação chuvosa nas regiões com clima quente (Levett 2001). Embora a incidência da doença pareça ser diminuída em países desenvolvidos, é considerada endêmica em vários países do sudeste da Ásia, da América central e do sul, na China e em África (Pappas *et al.* 2008). A leptospirose tornou-se uma ameaça para a saúde pública e foi classificada como doença re-emergente em humanos, devido à globalização e às mudanças climáticas (Costa *et al.* 2015).

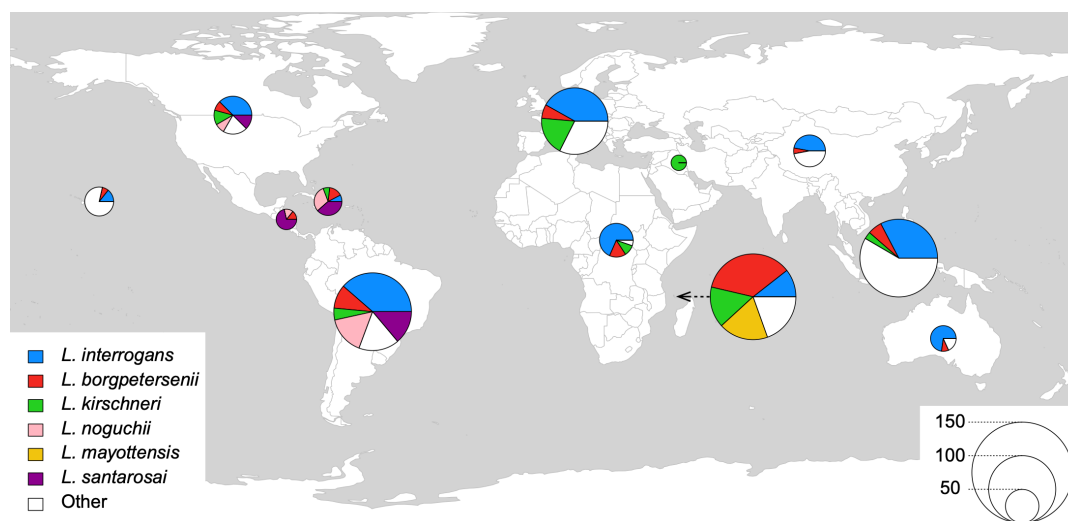


Figura 4 : Esquema representativo da origem geográfica das espécies patogênicas de *Leptospira* mais frequentes. Cada gráfico corresponde a uma determinada região do mundo, e da esquerda para a direita : Oceano Pacífico, América do Norte, América Central, Caraíbas, América do Sul, Europa, África, Oriente Médio, Oceano Índico, Ásia, Sudeste Asiático, Oceania. O tamanho dos gráficos é proporcional ao número de isolados, e a categoria « outras » inclui todas as espécies patogênicas que não foram individualizadas (Guglielmini *et al.* 2019).

De forma geral, os bovinos, como muitas espécies de mamíferos, podem ser infectados por várias espécies e serovares de *Leptospira*. Embora os sinais clínicos expressos por diferentes serovares sejam bastante semelhantes, é interessante referir que a localização geográfica é frequentemente associada a um tipo de leptospira. No entanto,

atualmente, a evolução da prevalência e da repartição dos diferentes serogrupos em função das regiões europeias é difícil de limitar numa escala de tempo. Além disso, os dados para os animais não estão centralizados à escala europeia e a padronização das análises por MAT é sujeita a restrições. Por exemplo, em França, dois estudos serológicos foram realizados para estudar a prevalência e a incidência dos serogrupos, entre 1988 e 2007 (André-Fontaine *et al.* 2010), e entre 2008 e 2011 (Ayrat *et al.* 2014). Esses estudos foram efectuados à escala nacional em rebanhos que apresentaram sinais clínicos compatíveis com a leptospirose, nomeadamente distúrbios reprodutivos, e realizados testes MAT. Destes estudos, foi concluído que os serogrupos Sejroe, Grippotyphosa e Australis foram os mais frequentemente encontrados, e com menor frequência foram identificados os serovares Icterohaemorrhagiae, Autumnalis (André-Fontaine *et al.* 2004) e Bataviae (Ayrat *et al.* 2014) (Gráficos 1 a 4).

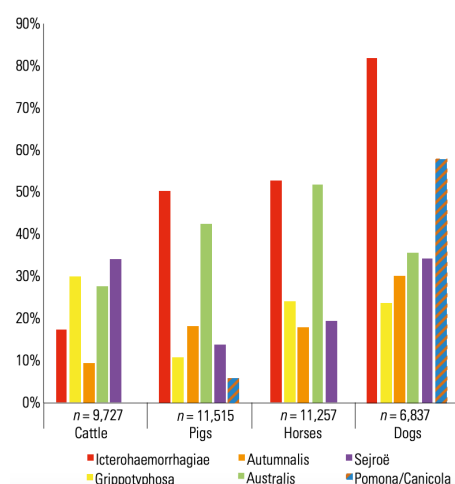


Gráfico 1 : Número de animais testados consoante o serogrupo, com a representação da percentagem de soros positivos em função dos soros testados de cada uma das espécies (André-Fontaine *et al.* 2010).

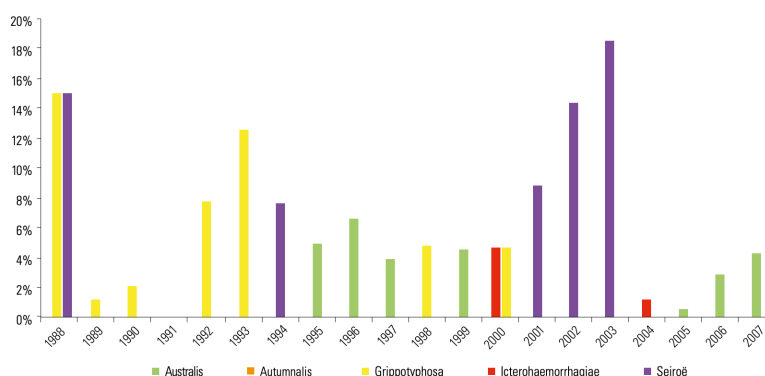


Gráfico 2 : Serogrupo dominante nos bovinos infectados ao longo dos anos (André-Fontaine *et al.* 2010).

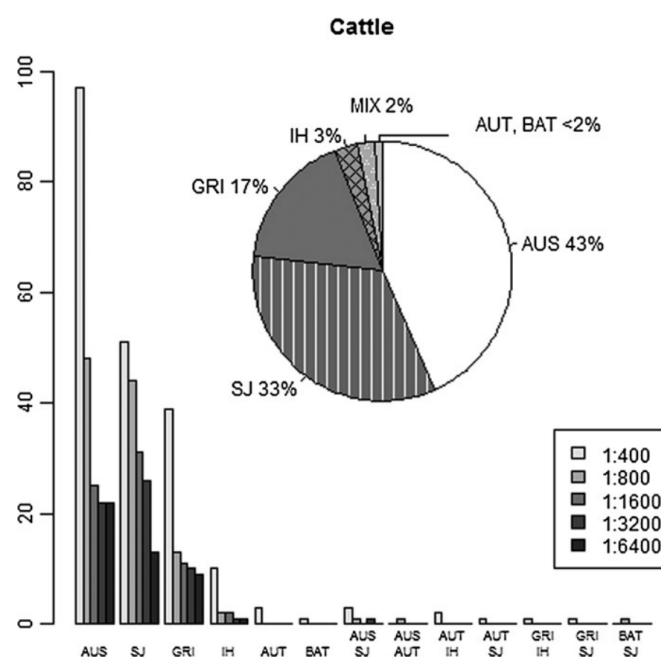


Gráfico 3 : Distribuição dos serogrupos de *Leptospira* dentro dos 394 rebanhos de bovinos suspeitos de leptospirose (Ayrál *et al.* 2014).

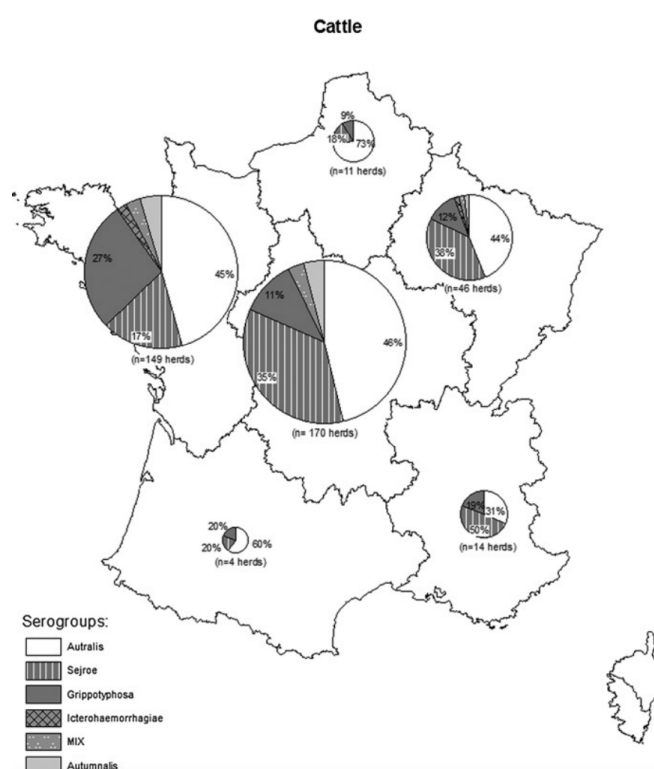


Gráfico 4 : Distribuição espacial dos serogrupos infectantes para os 394 rebanhos de bovinos testados consoante as regiões francesas (Ayrál *et al.* 2014).

À escala europeia, a distribuição dos serogrupos pode ser diferente da observada em França, consoante o país. Por exemplo, na Bélgica, os serogrupos Grippotyphosa, Australis, Ballum, Icterohaemorrhagiae, Autumnalis, Bataviae, Pyrogenes e Tarassovi foram identificados, associados a um surto de abortos em bovinos (Grégoire *et al.* 2020). Em Espanha, os serovares Bratislava (serogrupo Australis), Hardjo (serogrupo Serjoe) e Pomona (serogrupo Pomona) são os mais representados, mas outros serovares foram identificados como Grippotyphosa (serogrupo Grippotyphosa), Copenhageni (serogrupo Icterohaemorrhagiae) e Tarassovi (serogrupo Tarassovi) (Atxaerandio *et al.* 2005). Em Portugal, os serogrupos Icterohaemorrhagiae, Pomona, Serjoe (serovar Hardjo), Australis (serovar Bratislava) e Canicola (serovar Canicola) foram isolados e identificados em animais domésticos, tais como bovinos, suínos, cavalos e cães (Ferreira *et al.* 2020). Em Itália, o serovar Hardjo (serogrupo Serjoe) é o mais frequentemente identificado nos bovinos, seguido pelos serovares Pomona (serogrupo Pomona) e Bratislava (serogrupo Australis) (Tagliabue *et al.* 2016). A leptospirose nos bovinos é endémica na República de Irlanda onde a maioria dos rebanhos foram testados positivos aos testes serológicos para o serovar Hardjo (Ryan *et al.* 2012). Por seu lado, na Holanda, após uma séro-prevalência elevada nos rebanhos de bovinos do serovar Hardjo, um programa de controlo sanitário foi aplicado para lutar contra a doença, tornando-se desde 1994. Atualmente, através deste programa de erradicação da doença, foi possível baixar a incidência para 0,2% nos rebanhos leiteiros (Van der Brink *et al.* 2023).

Outros países como os Estados Unidos da América são também altamente afectados pela leptospirose bovina, e no qual foram identificados vários serogrupos Serjoe, Pomona, Icterohaemorrhagiae, Canicola, Grippotyphosa, Pyrogenes, Ballum, Autumnalis, Tarassovi, Australis (Anderson *et al.* 2023).

B. HOSPEDEIROS

A maioria dos mamíferos podem ser infectados por leptospirosas patogénicas, e alguns podem desempenhar o papel de reservatório de leptospirosas, sendo cronicamente infectados e excretando as bactérias de forma intermitente pela urina. É o caso por exemplo dos roedores, considerados como hospedeiros de manutenção dos serogrupos Ballum e Icterohaemorrhagiae. Outras espécies animais atuam também como hospedeiros de manutenção, tais como os suínos com os serogrupos Pomona e Tarassovi, os cavalos com o serogrupo Bratislava, e os bovinos e ovinos com o serogrupo Serjoe (Aliberti *et al.* 2022). Os cães são conhecidos por serem hospedeiros de manutenção dos serovares Canicola e Icterohaemorrhagiae. No entanto, desde alguns anos, vários serovares foram detetados em cães, tais como Grippotyphosa, Australis, Hardjo e Bratislava (Piredda *et al.* 2022). Embora sob-estimados, diversos serovares foram identificados em gatos, nomeadamente

Icterohaemorrhagiae, Canicola, Grippotyphosa, Pomona, Hardjo, Autumnalis e Ballum consoante a região geográfica (Hartmann *et al.* 2013). No entanto, o principal reservatório das leptospiros são os animais selvagens e o ambiente.

C. FONTES DE INFECÇÃO

A urina é considerada como a principal fonte de infecção, pois as leptospiros colonizam os túbulos contornados renais próximos, e sendo excretadas posteriormente para o ambiente pela urina. A duração e a intensidade da excreção urinária dependem dos serovares, bem como do hospedeiro, pois um animal clinicamente curado, pode ficar portador e excretar bactérias durante vários meses (Legrand 2007). Barragan *et al.* (2017) mostraram que as leptospiros são capazes de metabolizar a ureia, permitindo-lhes com esse facto sobreviver durante algumas horas na urina dos bovinos (pH 7-8) e por períodos maiores de tempo se a urina foi diluída. Por outro lado, o pH ácido da urina dos gatos poderia diminuir a viabilidade das leptospiros excretadas (Mwachi *et al.* 2015). O pH urinário pode ser influenciado também pela alimentação, com consequências na taxa de sobrevivência das leptospiros no exterior.

Existem também outras fonte de infecção, nomeadamente o leite. No entanto, uma mastite pode manifestar-se posteriormente à infecção por *Leptospira*, levando a alterações e diminuições da produção de leite. Consequentemente, o leite é geralmente descartado, o que diminui o risco de transmissão entre a mãe e o vitelo. Por outro lado, as secreções e excreções genitais, bem como os produtos de abortos, são também considerados fontes de infecção. Molinari *et al.* (2021) isolou, nos bovinos, leptospiros ao nível do útero, do oviduto, dos ovários e de fetos abortados. A excreção das leptospiros através das secreções genitais pode durar várias semanas após um aborto ou um parto numa vaca infetada. O serovar Hardjo foi detetado no oviduto e no útero até 90 dias após infecção experimental e nas vacas naturalmente infetadas após aborto ou parto. Igualmente, um vitelo recém-nascido viável pode hospedar a infeção várias semanas após o seu nascimento (Adugna 2016). Além disso, o serovar Hardjo também foi isolado nas vesículas seminais, no epidídimo e nos testículos de touros naturalmente infetados, e Eaglesome *et al.* (1997) demonstraram a presença de bactérias no sêmen de touros naturalmente e experimentalmente infectados.

D. MODOS DE TRANSMISSÃO

As principais formas de transmissão ocorrem por contato direto com urina ou secreções genitais de animais infetados, ou indiretamente através do meio ambiente, água ou alimentos contaminados (Grippi *et al.* 2020) (Figura 5). As bactérias podem também penetrar no organismo através de escoriações, feridas cutâneas, ou através da conjuntiva

ocular ou outras mucosas. A ingestão ou a imersão prolongada em água contaminada e a inalação de aerossóis podem também levar a infecção (Levett 2001). Nos bovinos, a fonte de infecção mais frequente é geralmente através de um indivíduo infetado que contamina as pastagens, as fontes de água ou os alimentos com urina, ou por fetos abortados ou descargas uterinas (Adugna 2016). Igualmente, podem ocorrer casos de transmissão venérea ou através de inseminação artificial, mas não são comuns (Grippi *et al.* 2020). A transmissão vertical entre a mãe e o vitelo foi também descrita, por via transplacentária ou através da ingestão de leite contaminado (Camart-Périé *et al.* 2012). Contudo, a transmissão da leptospirose por transferência de embriões produzidos *in vivo*, em bovinos, permanece pouco provável de ocorrer (Bielanski *et al.* 1998).

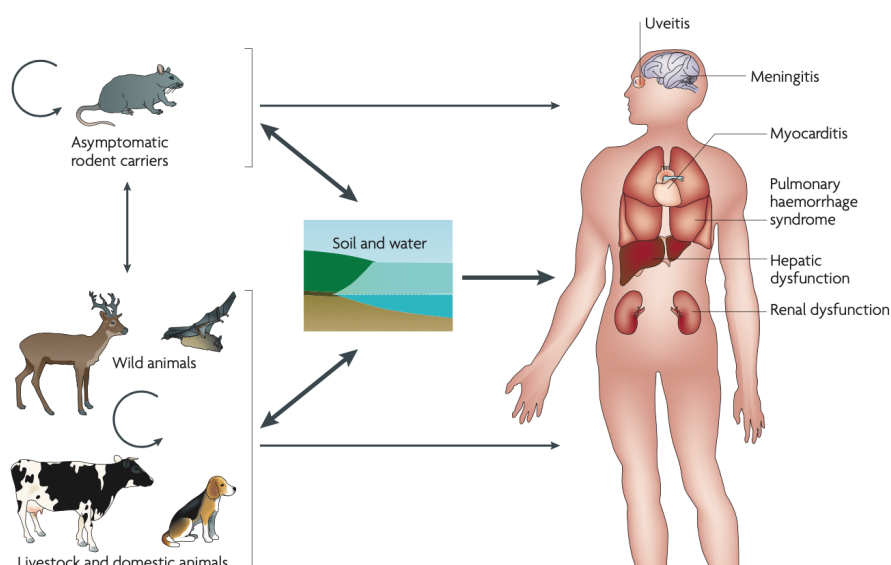


Figura 5 : Esquema do ciclo de transmissão da leptospirose (Ko *et al.* 2009).

E. PAPEL DO AMBIENTE NA TRANSMISSÃO DE LEPTOSPIRAS

Suponha-se que as espécies patogénicas de leptospiros não eram capazes de se multiplicar no ambiente, no entanto, sabe-se que a sobrevivência no exterior é possível sob determinadas condições (Bierque *et al.* 2020). Numerosos fatores tais como o pH do solo e da água, salinidade, humidade, temperatura, osmolalidade (Barragan *et al.* 2017), presença de componentes inibidores ou mesmo de algumas populações de microorganismos no ambiente, podem condicionar a sobrevivência das leptospiros no ambiente (Cassanovas-Massana *et al.* 2018). As espécies patogénicas podem viver no solo tendo uma taxa de humidade de 20%, nas águas e nos solos com um pH entre 5,5 e 7,6 e temperaturas entre 4 e 40°C. A motilidade e a disseminação das bactérias são fatores essenciais à sobrevivência destas no exterior, e permitem escapar das condições ambientais desfavoráveis. Nos

ambientes aquosos, a quimiotaxia das bactérias para a hemoglobina pode conduzir as leptospiros patogénicas a penetrar os organismos (Barragan *et al.* 2017).

Os dados atuais convergem para confirmar que as leptospiros patogénicas podem sobreviver e manterem-se infectantes durante várias semanas no ambiente, nomeadamente nas águas e nos solos, ainda que a capacidade de sobrevivência depende das espécies e dos serovares. Os episódios chuvosos importantes ou de inundações posteriormente a tempestades e furacões, foram associados a fortes epidemias de leptospirose. Dessas observações decorre uma hipótese segundo a qual as espécies patogénicas sobrevivem nos solos e que as chuvas lavam a superfície dos solos, suspendendo partículas e leptospiros nas águas superficiais, permitindo chegar aos cursos de águas e as fontes de água potável, expondo seres humanos e animais a potenciais infeções (Bierque *et al.* 2020) (Figura 6).

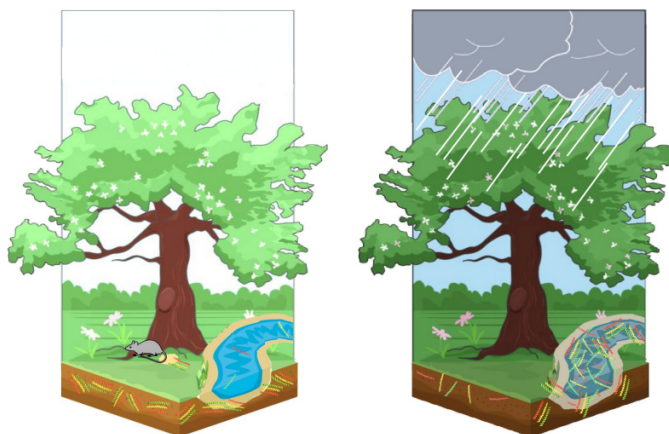


Figura 6 : Mecanismos hipotéticos da sobrevivência e da disseminação das leptospiros durante os episódios de chuvas importantes (Bierque *et al.* 2020).

Além disso, mostraram-se que as taxas de isolamento de leptospiros foram maiores em amostras de solo do que em amostras de água doce, apoiando a hipótese de que os solos representam o habitat original das leptospiros e um potencial reservatório ambiental das estirpes patogénicas, ou pelo menos um vetor temporário. Da mesma forma, as leptospiros possuem a capacidade de interagir com o microbiota ambiental e conseguem formar biofilmes, apesar da ausência de nutrientes no ambiente, ou de beneficiar duma proteção dentro dum biofilme multi-espécies (Bierque *et al.* 2020). Essas condições permitem às bactérias resistir a condições ambientais desfavoráveis, mas também favorecem a persistência e a transmissão da doença (Iraola *et al.* 2016). No entanto, o risco de infeção após o contato com leptospiros num ambiente contaminado depende da sua capacidade de sobreviver, persistir e infectar os hospedeiros.

III. ETAPAS DA INFECÇÃO

O mecanismo da infecção ocorre da mesma forma em qualquer hospedeiro e segue três fases. Inicialmente, uma fase de contaminação durante a qual as bactérias introduzem-se no organismo, seguido por uma fase de disseminação na qual as leptospiros multiplicam-se no sangue, e por último a fase de colonização dos diferentes órgãos, em particular os rins nos quais multiplicam-se e serão excretadas posteriormente com a urina.

A. FASE DE CONTAMINAÇÃO

Após a entrada das leptospiros no organismo, elas atravessam as barreiras tecidulares e difundem-se por via hematogénica, levando a uma infeção sistémica (Mohammed *et al.* 2011). Num estado precoce da infeção, as leptospiros foram encontradas nos tecidos adiposos do hospedeiro, onde se desenvolvem antes de se disseminar por via hematogénica pelo resto do organismo (Ozuru *et al.* 2017). O movimento gerado pelos flagelos permite às leptospiros entrar na circulação sanguínea rapidamente (Samrot *et al.* 2021), e foram encontradas na circulação sanguínea 10 minutos após terem sido inoculadas em animais por via intraperitoneal, intradérmica e intra-ocular (Banfi *et al.* 1982). A variedade de proteínas adesivas das estirpes patogénicas permite-lhes ligarem-se a várias células, nomeadamente às células endoteliais, aos monócitos, às células epiteliais renais e fibroblastos. Podem também interagir e ligar-se a numerosos componentes da matriz extracelular (MEC), bem como ao plasminogénio e a vários componentes do complemento (Samrot *et al.* 2021). A sua forma em espiral permite-lhe deslocar-se facilmente através das barreiras mais viscosas, contribuindo para o seu carácter invasivo.

B. FASE DE LEPTOSPIREMIA

Uma vez dentro do compartimento vascular, as bactérias disseminam-se pelo organismo. Esta fase é nomeada a fase de leptospiromia ou de bacteriemia e vai prolongar-se até que o hospedeiro desenvolve uma resposta imunitária eficaz, ocorrendo geralmente uma ou duas semanas após a infeção. Durante as primeiras fases da infeção, as leptospiros escapam aos mecanismos de defesa do organismo, sobrevivendo aos macrófagos e resistindo aos radicais livres de oxigénio (ROS). As leptospiros são capazes de recrutar reguladores solúveis do complemento, impedindo a activação e a formação de uma ataque da via lítica na superfície das membranas (Yamaguchi *et al.* 2018). Durante a disseminação hematogénica, as leptospiros podem lesionar o endotélio vascular, provocando hemorragias (Figura 7). São capazes de interagir com as proteínas da coagulação e ativarem a cascata de coagulação, podendo levar a uma coagulação

intravascular disseminada (CIVD) (Ko *et al.* 2009). A carga bacteriana é mais importante nos tecidos altamente vascularizados, tais como o baço, o fígado e os rins. Foram também detetadas no cérebro e nos olhos de animais infectados após administrações intra-peritoneais (Wunder *et al.* 2016).

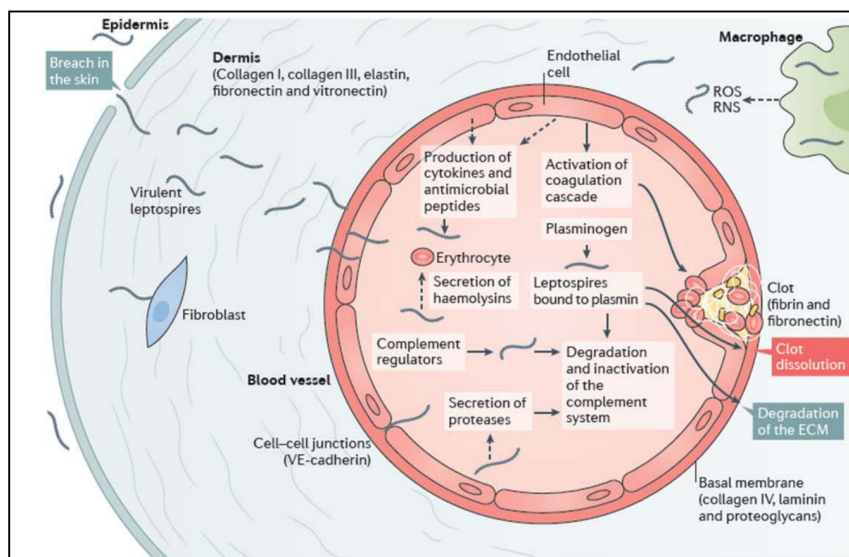


Figura 7 : Representação das fases de contaminação e de difusão hematogénica das leptospiros (Picardeau 2017).

C. FASE IMUNITÁRIA

A fase de leptospiremia é seguida por uma fase imunitária caracterizada pela libertação de anticorpos na circulação sanguínea e pela excreção das bactérias com a urina. Durante esta fase, a maioria das bactérias são eliminadas do sangue. No entanto, uma fração das bactérias podem escapar aos mecanismos de defesa do organismo e migrar para os órgãos. Observa-se uma maior concentração das bactérias nos rins, nomeadamente nos túbulos contornados renais próximos, nos quais as bactérias persistem e multiplicam-se, sendo excretadas posteriormente com a urina. Com efeito, após a inoculação de *L. interrogans* em ratos, as bactérias só foram encontradas nos rins uma semana depois da infecção. Os rins são os únicos reservatórios de leptospiros durante a fase crónica, pois nenhum DNA leptospírico foi encontrado no sangue ou nos órgãos-alvos da fase aguda. Durante o início da fase crónica, as leptospiros multiplicam-se dentro das estruturas renais antes de atingir um estado estacionário onde as taxas de replicação e de perdas são equilibradas, que normalmente acontece em duas a três semanas. Nenhum aumento na população de leptospiros foi observado posteriormente, sugerindo que a contaminação dos túbulos renais é contida pelo sistema imunitário e não haverá colonização de novos nefrónios (Ratet *et al.* 2014).

Diversos mecanismos podem estar envolvidos na sobrevivência das leptospiros nos rins, nomeadamente na formação de biofilmes. Estes últimos compõem-se por agrupamento de células bacterianas organizadas e aderentes às superfícies, envolvido por uma matriz de polímero orgânico, chamado exopolissacarídeo. A formação de biofilme *in vitro* já foi observada nas estirpes saprófitas e patogénicas de *Leptospira* (Ristow *et al.* 2008). Por exemplo em cães naturalmente infectados por *L. interrogans*, biofilmes foram observados *in vitro*, a partir do 7º dia de incubação, e permitiram o crescimento da comunidade bacteriana e as trocas de nutrientes, resíduos e gases com o ambiente (Rodrigo *et al.* 2023). Por outro lado, formações de estruturas de tipo biofilmes foram também observadas *in vivo* em ratos infetados naturalmente e experimentalmente por estirpes patogénicas durante a colonização renal. Este facto pode explicar pela resistência aos antibióticos observada depois da implementação de tratamentos durante a fase crónica da doença (Santos *et al.* 2021).

Essa capacidade de formação dum biofilme pode transcrever-se *in vivo*, pois, mesmo se as condições *in vivo* e *in vitro* podem diferir na expressão genotípica e fenotípica, a formação de biofilmes foi documentada para as estirpes estudadas. Os biofilmes assim formados desempenham um papel na resistência aos antibióticos por fornecer um ambiente favorável à transferência horizontal de genes de resistência e à comunicação química entre as células. Além disso, as bactérias podem produzir enzimas que degradam os antibióticos, modificando às moléculas alvos e podendo diminuir a afinidade para os antibióticos. A resistência aos antibióticos poderia ser influenciada também por outros fatores como a arquitetura, a organização e a produção do exopolissacarídeo (Rodrigo *et al.* 2023). Da mesma forma, foi sugerido que o desprendimento das bactérias do biofilme permitiria a disseminação destas e a colonização subsequente de novos nichos. Por outro lado, o desprendimento do biofilme nos rins poderia relacionar-se com a excreção intermitente das bactérias pela urina nos animais cronicamente infetados, e a eliminação das bactérias em agregados apresentaria vantagens na sobrevivência das bactérias no exterior (Yamaguchi *et al.* 2018).

IV. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Os serovares responsáveis pela infecção nos bovinos são classificados em dois grupos, em que o primeiro contém os serovares adaptados ao hospedeiro e mantidos cronicamente nos rins, enquanto o segundo é representado pelas infeções acidentais causadas por serovares mantidos por outras espécies animais domésticos e selvagens. Os bovinos são portadores crónicos para o serovar Hardjo, representado pelas espécies *L. borgpetersenii* serovar Hardjo tipo hardjobovis e *L. interrogans* serovar Hardjo tipo hardjoprajitno. A infecção é geralmente sub-clínica e os indivíduos desenvolvem poucos ou nenhuns sinais clínicos, mas a infecção é responsável por causar perdas económicas

importantes (Wilson-Welder *et al.* 2021). Os bovinos são hospedeiros acidentais para outros serovares, dependendo da distribuição geográfica e das especificidades epidemiológicas locais. Podem ser infetados por exemplo pelo serogrupo Pomona, considerado como o segundo serovar mais prevalente no mundo (Underwood *et al.* 2015), e pelos serogrupos Icterohaemorrhagiae, Hebdomadis, Grippotyphosa, Canicola (Grégoire *et al.* 2020), Pyrogenes, Autumnalis, Australis, Javanica e Tarassovi. As infeções acidentais manifestam-se por ocorrência súbita duma taxa de abortos elevada, ocorrendo algumas semanas após as manifestações agudas da doença (Aliberti *et al.* 2022).

Nos bovinos, a fase de leptospiremia tem uma duração entre 4 e 7 dias, posteriormente a qual invadem vários órgãos como o fígado, os pulmões, os rins, o trato genital, o tecido mamário e as meninges (Camart-Périeré *et al.* 2012). O período de incubação dura geralmente entre 2 e 20 dias. Anticorpos podem ser detectados no fim da fase de bacteriemia e marcam o início da resposta humoral responsável pela eliminação das leptospiras na maioria dos tecidos (Callan 2015).

A. FORMAS HIPERAGUDAS

As formas hiperagudas da leptospirose não são frequentes, mas já foram descritas sobretudo em animais jovens, e com uma evolução muito rápida levando à morte do animal. O sintoma predominante é uma hemoglobinúria, resultando de uma tubulonefrite marcada, que ocorre geralmente pouco tempo antes da morte do animal. Outros sinais clínicos como anorexia, icterícia, diarreia hemorrágica com tenesmo foram também descritos. Estas formas hiperagudas podem ser associadas ao serovar Hardjo, bem como outros serovares (Camart-Périeré *et al.* 2012).

B. FORMAS AGUDAS

Os animais adultos estão mais frequentemente associados às formas agudas da doença. Na forma aguda da doença, a taxa de mortalidade é elevada e em caso de cura, a convalescência pode ser prolongada (Adugna 2016). Em vacas leiteiras, o primeiro sinal visível é geralmente uma diminuição da produção de leite, nomeado *milk drop syndrome*, no qual as vacas infectadas secam em 3 ou 4 dias. Sinais de mamite podem também ocorrer com alteração da cor do leite, tornando-se amarelado a alaranjado (Adugna 2016), ou rosa associado à presença de coágulos de sangue (Camart-Périeré *et al.* 2012). Contudo, o úbere fica mole e macio, sem sinais de calor nem dor na palpação, e todos os quartos são atingidos. A produção de leite volta ao normal em 10-14 dias após a infecção, após o desenvolvimento da resposta humoral.

Durante as fases iniciais da bacteriemia e consoante o serovar, uma anemia hemolítica pode ocorrer posteriormente à libertação de hemolisinas pelas leptospiros. A anemia pode levar a uma taquicardia associada ao aumento dos ruídos cardíacos, a um choque pre-cordial palpável ao nível do apex cardíaco, e a uma dispneia (Adugna 2016). Além disso, pode surgir uma hipertermia marcada, com temperatura corporal entre 40 e 41°C, acompanhada por icterícia geralmente discreta, uma hemoglobínúria e uma poliúria (Camart-Périer *et al.* 2012). Igualmente, a difusão hematogênica pode provocar lesões no fígado, podendo levar a uma insuficiência hepática. Sinais de insuficiência hepática podem manifestar-se por exemplo com o desenvolvimento de uma fotossensibilidade associada a lesões cutâneas, em vacas com pele clara ou nas zonas despigmentadas com coloração contrastada. Outras manifestações foram também descritas, como casos de meningite, nefrite aguda e dermatite necrosante relacionadas com o depósito de complexos imunes (Camart-Périer *et al.* 2012). A excreção urinária de leptospiros pode durar várias semanas até meses consoante o serovar e apesar de uma cura clínica do animal.

Nos recém-nascidos, a icterícia é uma manifestação aguda frequentemente observada subsequente à infecção por *Leptospira*, e pode ser provocada pela hemólise consecutiva à produção de hemolisinas (Grégoire *et al.* 2020).

C. FORMAS CRÓNICAS

Nos bovinos, a forma crónica da leptospirose é a mais frequente, e manifesta-se por distúrbios reprodutivos, nomeadamente abortos, mortinatalidade, esterilidade e nascimento de vitelos infectados de forma persistente (Bulla-Castañeda *et al.* 2022), e por diminuição da produção leiteira (Camart-Périer *et al.* 2012). Pode manifestar-se também por sinais mais subtis como hipofertilidade e morte embrionária precoce (Bulla-Castañeda *et al.* 2022). O aborto ocorre geralmente no último terço da gestação (Camart-Périer *et al.* 2012), mas pode ocorrer a qualquer momento a partir do 4º mês de gestação (Adugna 2016). A causa principal de aborto não é conhecida, mas pensa-se que as leptospiros infectam o feto pela via transplacentária e através da veia umbilical. O aborto pode ser então a consequência directa da colonização do feto pelas bactérias (Camart-Périer *et al.* 2012), ou ser relacionado com alterações degenerativas do epitélio placentário (Adugna 2016). O aborto não é relacionado com a fase de invasão da mãe, que já desenvolveu normalmente a sua resposta imunitária (Camart-Périer *et al.* 2012), e ocorre geralmente várias semanas até meses após a infecção, podendo ser o único sinal clínico da doença (Adugna 2016). Todas estas manifestações clínicas traduzem-se pelo aumento do intervalo entre partos, do intervalo parto-inseminação ou parto-concepção, mas também pelo aumento do número de inseminações artificiais e da taxa de refugo dos animais (Camart-Périer *et al.* 2012). A ocorrência de meningite foi descrita em casos crónicos associados ao serovar Pomona, e

caracterizados por ataxia, ptialismo e rigidez muscular e conjuntival (Adugna 2016). A infecção renal crónica pode levar a alterações histológicas, uma nefrite intersticial leve ou linfocítica difusa, severa e com fibrose. Oligúria pode ser observada no caso de nefrite intersticial ou de nefrose hemoglobinúrica (Callan 2015).

Inicialmente, pensava-se que a presença de leptospiros no trato reprodutor resultou de uma bacteriemia posteriormente à colonização renal. No entanto, foi sugerido que a leptospirose genital deverá ser considerada como um síndrome específico dissociado da doença renal e sistémica, nomeado *Bovine Genital Leptospirosis* (BGL), caracterizado pela colonização primária do aparelho reprodutor pelas leptospiros. Este síndrome é geralmente associado ao serovar Hardjo, e apresenta-se sob a forma de uma doença crónica e silenciosa, e manifesta-se por morte embrionária precoce, hipofertilidade e estros repetitivos (Di Azevedo *et al.* 2021). Duas hipóteses foram propostas para explicar os sinais clínicos : a alteração do ambiente uterino pela presença de leptospiros no útero, levando a uma inflamação e afectando a sobrevivência ou a implantação do embrião; ou a invasão directa do embrião pelas bactérias, levando a danos graves e morte subsequente (Loureiro *et al.* 2020). A primeira hipótese foi mantida, e pensava-se que o serovar Hardjo pode causar endometrite em vacas infectadas, tornando o ambiente uterino hostil à gestação, como foi observado em cadelas e em éguas (Molinari *et al.* 2021). Em vacas, as células epiteliais e estromais do endométrio são capazes de reconhecer componentes da parede celular das bactérias Gram + e Gram - através dos receptores de reconhecimento de padrões ou PRR (*Pattern Recognition Receptors*), resultando na secreção de mediadores inflamatórios e na inflamação subsequente do endométrio. No entanto, *in vitro*, a exposição de leptospiros inativadas ou de componentes purificados da sua membrana externa nas células epiteliais endometriais não resulta na indução de uma resposta inflamatória, sugerindo que estas não são capazes de reconhecer este agente patogénico ou que as leptospiros escapam ao reconhecimento pelos PRR. Com efeito, as leptospiros são capazes escapar ao reconhecimento pelos alguns PRR, o que poderia explicar a falha reprodutiva nos indivíduos infectados (Molinari *et al.* 2021).

V. DIAGNÓSTICO

A. SUSPEITA CLÍNICA

O diagnóstico da leptospirose é difícil de estabelecer devido à falta de especificidade dos sinais clínicos. No entanto, esta doença deve ser suspeita no caso de ocorrência de abortos, nomeadamente no último terço da gestação, de distúrbios reprodutivos e aparecimento agudo de hipertermia associada a icterícia e hemoglobinúria. Os elementos

epidemiológicos podem também ajudar na orientação do diagnóstico, tal como a presença de roedores na exploração, o contato com águas doces podendo alojar roedores, episódios chuvosos importantes ou inundações, a presença de animais selvagens ou roedores nas pastagens. Igualmente, a categoria dos animais afectados pode orientar o diagnóstico, como por exemplo as manifestações clínicas podendo ser atribuídas à leptospirose nos jovens ou novamente introduzidos no rebanho (Camart-Périé *et al.* 2012). A leptospirose aguda deve ser diferenciada de outras doenças que provocam anemia hemolítica com ou sem hemoglobinúria, como a anasplamose, babesiose, hemoglobinúria pós-parto, hemoglobinúria bacilar (Adugna 2016), e intoxicações como a intoxicação ao cobre (Legrand 2007). A leptospirose crónica causa aborto e o diagnóstico diferencial pode conter a neosporose, a diarreia viral bovina (BVD), a rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), a brucelose, a febre catarral ovina, a campilobacteriose, clamidiose, listeriose, tricomonase, as infecções por *Trueperella pyogenes*, *Salmonella* spp., *Mycoplasma* spp., ou *Histophilus somni* e as infeções micóticas (Tibary 2021).

B. ANÁLISES BIOQUÍMICAS E HEMATOLÓGICAS

Quando há suspeita de leptospirose aguda, exames complementares como análises bioquímicas e hematológicas podem ser realizadas. Estas análises podem revelar uma afeção hepática e renal, visível pelo aumento da ureia e da creatina, uma hipercalcemia e hiperfosfatemia, bem como o aumento das taxas séricas da bilirrubina, das transaminases (ALT e AST) e dos marcadores da colestase (GGT e ALP). Os parâmetros sanguíneos podem ser alterados, com ocorrência de uma leucopenia transitória seguida por neutrofilia, indicando um processo infeccioso. Uma anemia regenerativa moderada pode observar-se durante a doença aguda, por vezes associada a trombocitopenia. Estas modificações são inespecíficas e não são sistematicamente observadas em todas as infeções por *Leptospira*. Uma urianálise pode ser efetuada com uma tira urinária, podendo evidenciar uma hemoglobinúria. Uma proteinúria e piúria podem ocorrer no caso de nefrite intersticial (Callan 2015). Cilindros podem ser observados também na análise do sedimento urinário (Camart-Périé *et al.* 2012).

C. EXAMES COMPLEMENTARES

Existem diversos métodos de diagnóstico para confirmar a suspeita de leptospirose nos bovinos. Os tipos de amostras são diversos e a sua escolha depende da cronologia da infecção (Figura 8). Durante a fase de leptospiremia, as bactérias encontram-se no sangue e por isso é feita a recolha de amostras sanguíneas para análise. As análises deverão ser feitas nos primeiros 12 dias após a infecção, correspondendo aos primeiros 10 dias após o

aparecimento dos sinais clínicos (Legrand 2007). Na fase imunitária, os anticorpos podem ser detetados 10 a 12 dias após infecção, ou seja 8 a 10 dias após o início dos sinais clínicos (Camart-Périé *et al.* 2012). Durante esta etapa, o aumento dos títulos de anticorpos está relacionado com a eliminação das bactérias no sangue (Picardeau 2013). Os testes de diagnóstico desempenham um papel determinante na vigilância e na manutenção da saúde do rebanho, na detecção da exposição e a identificação dos agentes infecciosos durante uma infecção individual ou uma epidemia. Os testes para o diagnóstico da leptospirose não são perfeitos e a combinação destes métodos com a recolha de amostras em cada fase da doença melhora à precisão do diagnóstico.

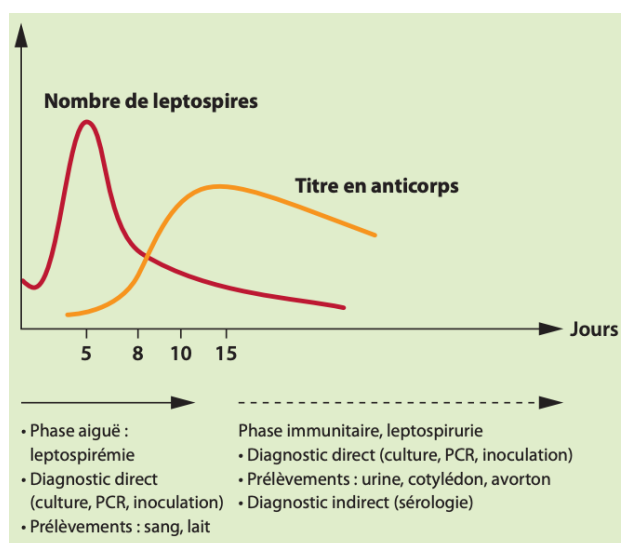


Figura 8 : Diferenças entre técnicas de laboratório utilizadas no diagnóstico da leptospirose em função da cronologia da doença (Camart-Périé *et al.* 2012).

1. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DIRETO

As leptospirose podem ser isoladas a partir de diferentes amostras, como o sangue, o leite, o líquido cefalo-raquidiano (LCR), a urina, o sêmen e em diversos órgãos, nomeadamente o fígado, os rins, as glândulas adrenais ou suprarenais (Camart-Périé *et al.* 2012), os pulmões e o cérebro (OIE 2021). A evidência de leptospirose no sangue ou no leite nos animais com sinais clínicos de leptospirose, é considerado como diagnóstico. No entanto, a deteção e o isolamento das leptospirose pode falhar durante a fase aguda, por causa duma bacteriemia demasiada fraca ou curta, ou por uma colheita tardia ou por uma administração de antibióticos que leva à eliminação rápida das bactérias no sangue (Picardeau 2013). As amostras de sangue devem ser colhidas durante vários dias, pois a bacteriemia pode ser intermitente. Os tubos EDTA ou de heparina são recomendados para colher o sangue (Camart-Périé *et al.* 2012), e os tubos de citrato devem ser descartados por

terem um meio ácido prejudicial às leptospiros (Legrand 2007). A partir do 10º dia pós-infecção, as leptospiros são excretadas durante várias semanas até meses na urina. A urina pode ser colhida por cistocentese ou catéter urinário, da forma mais asséptica possível (Camart-Périé *et al.* 2012), ou pela administração de furosemida por via intramuscular (IM) ou intravenosa (IV), com dose 0,5-1,0 mg/Kg. Os primeiros jactos da urina devem ser eliminados e recolhida cerca de 10 mL de urina da segunda micção e conservada no frio e protegido da luz durante o transporte até ao laboratório. Para avaliar o estado de infecção endémica ao serovar Hardjo de um rebanho, pode recolher-se amostras de um conjunto de 10-15 animais adultos (Callan 2015). Além disso, podem ser realizadas amostragens em diversos órgãos internos durante a necrópsia de animais mortos, fetos abortados ou nados-mortos, devendo ser efectuadas rapidamente após a morte do animal, pois a autólise provoca a destruição das leptospiros e a contaminação dos tecidos por outros germes altera a detecção das leptospiros (Legrand 2007). A presença de leptospiros nos fluidos corporais ou órgãos internos de fetos abortos ou nados-mortos é considerado como diagnóstico da leptospirose crónica da mãe e constitui a prova duma infecção ativa do feto. A evidência de leptospiros no trato genital, nos rins ou na urina deve ser interpretada levando em conta os sinais clínicos e os resultados serológicos, pois esses resultados podem evidenciar que o animal seja portador (OIE 2021).

a. MICROSCÓPIO ÓTICO E CULTURA

A visualização das leptospiros pode realizar-se a partir de amostras sanguíneas ou urinárias, e por causa do seu tamanho a microscopia de campo escuro é necessária. Contudo, este método é pouco sensível e específico, e o limite de detecção é de 10^4 leptospiros/mL de sangue ao exame direto. O risco de falso positivo é também importante por causa da presença de detritos celulares e artefactos (Picardeau 2013). Além disso, este método não permite distinguir outros tipos de espiroquetas, e a diferenciação entre *Leptospira*, *Leptonema* e *Turneria* não é possível por microscopia (Legrand 2007).

Por outro lado, a realização de culturas permite o isolamento das leptospiros. Contudo, algumas condições devem ser cumpridas, como por exemplo a ausência de resíduos de antibióticos, que a autólise dos tecidos não seja avançada, que seja feita cultura das amostras dos tecidos rapidamente após a amostragem, e no caso de amostra de urina, que o pH seja apropriado. Se as amostras de tecidos ou líquidos não forem transportados rapidamente para a cultura, a amostra deve ser conservado entre 2 e 5°C para evitar a proliferação de outras bactérias e autólise de tecidos. Um meio de cultura contendo albumina sérica de bovino (BSA) a 1% com 5-fluorouracil a 100-200 µg/mL deve

ser utilizado como meio de transporte das amostras (OIE 2021). As leptospiros são difíceis de conservar nas amostras urinárias de bovinos pois a viabilidade é breve, as amostras devem ser tratadas nas duas horas após a colheita para garantir o sucesso do isolamento. Por esta razão, pode ser utilizado o *Leptospira Transport Medium* (LTM) para o transporte das amostras. Este melhora o isolamento das leptospiros a partir das amostras urinárias, e é composto por um meio base, um enriquecimento constituído por BSA ou soro de coelho associado com Tween 80, e fatores de crescimento. Um suporte seletivo é adicionado para impedir o crescimento de microorganismos contaminantes, composto por 5-fluorouracil, sulfato de neomicina e sulfanilamida. Este meio possui também um indicador de pH, o fenol vermelho, que toma uma cor amarela-laranja a pH inferior a 7, vermelho a pH quase de 7,5, e roxo a pH superior a 7. Durante a amostragem da urina ácida ou alcalina, podem ser adicionadas soluções para corrigir o pH, como solução de vinagre (1:3) ou de bicarbonato de sódio 8%, para manter o pH a volta de 7,5 e garantir a viabilidade da amostra. As leptospiros podem sobreviver durante períodos mais longos nos meios alcalinos (Guedes *et al.* 2020).

O meio Ellinghausen McCullough, modificado por Johnson e Harris (EMHJ) é o meio mais usualmente utilizado para a cultura e o isolamento de leptospiros (Steinparzer *et al.* 2021), e contém ácido oleico, BSA e polisorbato (Tween 80) (Evangelista *et al.* 2010). Frequentemente ocorre a contaminação das amostras durante a recolha. Por este facto, elementos seletivos são adicionados ao meio, tal como 5-fluorouracil, cloranfenicol, ácido nalidíxico, neomicina e vancomicina, a partir de amostras urinárias (Chideroli *et al.* 2017). Pode ser também adicionado a combinação de agentes seletivos STAFF (Sulfametoxazol, Trimetoprima, Anfotericina, Fosfomicina e 5-fluorouracil), que permite também controlar a contaminação em cultura de leptospiros patogénicas a partir de amostras urinárias bovinas e secreções vaginais (Loureiro *et al.* 2015). No entanto, a utilização de agentes seletivos pode reduzir as probabilidades de isolamento das bactérias quando são apresentadas em pequeno número, e em meios selectivos contendo vários antibióticos pode impedir que algumas espécies se desenvolvam (OIE 2021).

As culturas devem ser incubadas a $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante pelo menos 16 semanas. O tempo necessário para deteção de uma cultura positiva varia de acordo com o serovar e o número de bactérias presentes na amostra. As culturas devem ser observadas a cada uma ou duas semanas ao microscópio de campo escuro (OIE 2021), e para concluir que a cultura é negativa, deverá decorrer pelo menos dois meses (Legrand 2007).

Culturas positivas podem ser observadas em 7 a 10 dias após a inoculação para os serovares menos exigentes, como Pomona e Grippotyphosa (OIE 2021). No entanto, outros serovares, como Bratislava e Hardjo, podem necessitar de mais tempo. A principal

dificuldade reside no isolamento do serovar Hardjo por ter necessidades nutricionais extremas e os meios de cultura tradicionais não serem eficazes para o seu isolamento. Por esta razão, pode ser utilizada a combinação do meio de base EMJH com outros ingredientes, como o piruvato de sódio e o superóxido dismutase, que permitem o crescimento inicial das bactérias, e o soro bovino fetal que permite a sua manutenção ulterior.

b. TÉCNICAS DE COLORAÇÕES IMUNOQUÍMICAS

As técnicas de colorações imunoquímicas, tais como imunofluorescência ou outras técnicas imunohistoquímicas, permitem a deteção de leptospiros, podendo ser realizadas a partir de diferentes tipos de amostras, como o fígado, rins, trato genital, sangue e urina. A imunofluorescência realizada sobre amostras urinárias bem como em cortes renais de fetos é uma técnica mais sensível, mais rápida e pode ser utilizada em amostras congeladas (Camart-Périé *et al.* 2012). Estas técnicas permitem o diagnóstico da infeção numa amostra que não pode ser utilizada para uma cultura, como no caso de um animal que recebeu um tratamento antibiótico, no qual se torna difícil detetar bactérias. Estas técnicas podem também ser utilizadas se é necessário um diagnóstico rápido. Contudo, o sucesso destas técnicas depende do número de microorganismos presentes, e são então menos adaptadas ao diagnóstico de um portador crónico, no qual o número de bactérias pode ser fraco ou localizado. Além disto, estes métodos não permitem determinar o serovar (OIE 2021).

c. MÉTODOS MOLECULARES

Testes baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) são cada vez mais utilizados para a deteção de leptospiros nos tecidos e fluidos corporais comparativamente aos métodos serológicos, por estes apresentarem uma maior sensibilidade e especificidade. Além disso, fornecem um diagnóstico precoce pois não necessitam da presença de organismos viáveis e o DNA bacteriano pode ser detetado antes que a resposta serológica se desenvolve (Di Azevedo *et al.* 2021). O PCR tempo-real é mais rápido na obtenção de resultados do que o PCR clássico e menos sensível às contaminações (Picardeau 2013). No entanto, ainda não permitem identificar o serovar (OIE 2021).

Os testes PCR são baseados na deteção de genes universalmente presentes nas bactérias, como *gryB*, *rrs* e *secY*, ou na deteção de genes limitados às leptospiros patogénicos como as lipoproteínas L21 (LipL21), L32 (LipL32), L41 (LipL41), e as proteínas A e B de tipo imunoglobulina (LigA e LigB). O gene *rrs* permite a distinção das espécies saprofíticas, intermediárias e patogénicas, mas possui uma fraca resolução taxonómica, não

permitindo distinguir as espécies de *Leptospira* dentro de um clado. O gene LipL32 é o principal alvo dos testes PCR para detecção de leptospiros, principalmente nas vias urinárias e/ou reprodutivas. Estes testes evidenciaram uma frequência elevada de animais portadores ao nível vaginal, nomeadamente nas vacas, consolidando a transmissão venérea da doença. Além disto, nas amostras positivas a LipL32 por PCR, a análise da sequência do gene *secY* permite distinguir a espécie, o serovar e o genótipo de *Leptospira*, por possuir um forte efeito discriminante. A identificação do gene *secY* por PCR pode ser feita para o diagnóstico da doença, mas a presença deste gene noutras bactérias pode levar a resultados falsos negativos. É por esta razão que este gene é mais utilizado para fins discriminatórios e taxonómicos, e permite fornecer informações epidemiológicas. Por outro lado, o gene *gryB* pode ser utilizado para estudos filogenéticos por ser mais polimórfico do que o gene *secY*. O gene *flaB*, codifica para as proteínas dos endoflagelos, pelo que também pode ser utilizado para distinguir as espécies de leptospiros, e para o diagnóstico da doença (Di Azevedo *et al.* 2021).

2. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO INDIRETO

Os testes serológicos utilizam-se usualmente para confirmar o diagnóstico clínico, estimar a prevalência num rebanho e realizar rastreios epidemiológicos, evidenciando anticorpos dirigidos às leptospiros. Se houver suspeita de doença aguda, duas amostras devem ser recolhidas e efetuada a análise com 8-10 dias de intervalo. O animal suspeito recebe um tratamento antibiótico durante este intervalo, apesar deste procedimento poder atrasar o aparecimento de anticorpos (Camart-Périé *et al.* 2012). Os anticorpos podem persistir durante semanas até meses, e em alguns casos durante anos. Contudo, os títulos de anticorpos podem subitamente diminuir até níveis não detectáveis nos animais portadores crónicos. Portanto, é importante ter acesso ao histórico clínico do animal e à cronologia dos eventos (OIE 2021).

a. TESTE DE MICRO-AGLUTINAÇÃO (MAT)

A MAT constitui o teste serológico de referência para diagnosticar uma infeção aguda num animal individual que apresenta sinais clínicos evocando a leptospirose. Pode ser utilizado à escala do rebanho, com amostragens no mínimo de 10 animais, durante os quais o diagnóstico individual é difícil (OIE 2021). Este teste consiste na avaliação, ao microscópio de campo escuro, do grau de aglutinação das culturas de leptospiros no soro de um indivíduo infetado. Este teste precisa da manutenção de estirpes vivas de *Leptospira* de referência, utilizadas como antigénios. A coleção de antigénios compreende as estirpes representativas dos princípios serogrupos (Picardeau 2013). Para uma sensibilidade ótima,

convém utilizar antígenos representativos dos serogrupos existentes nas regiões onde se encontram os animais, e de preferência, representando as estirpes de todos os serogrupos conhecidos (OIE 2021). O princípio de MAT consiste em incubar diluições em série de soro do animal suspeito com diferentes serovares de leptospiros. Além disso, o MAT pode ser efetuado com outros fluidos, como LCR ou humor aquoso, e nos fetos abortados, o teste pode ser realizado a partir de fluido peritoneal ou pericárdico (Sykes *et al.* 2022). Se o soro contém anticorpos, provoca a aglutinação das bactérias, no entanto não distingue os anticorpos aglutinantes IgM e IgG (Camart-Périeré *et al.* 2012). As IgM são as primeiras a surgir durante uma infecção por *Leptospira*, seguida pelo aparecimento das IgG, que persistem durante mais tempo do que as IgM (Adugna 2016). Um soro é considerado positivo se pelo menos 50% das leptospiros apresentam-se aglutinadas em comparação com uma amostra de antígeno testemunho, no qual não é incluído o soro. A confirmação de um caso positivo de leptospirose por MAT necessita da recolha e da análise de duas amostras com duas semanas de intervalo, com observação de uma seroconversão ou de um aumento dos títulos de anticorpos (Sykes *et al.* 2022). O título de positividade é fixado a 1/100, podendo ser fixado a 1/400 nas zonas endémicas, e diluições mais baixas aumentam a sensibilidade do teste. Um título de 1/100 ou 1/200 pode corresponder ao início da doença, por uma infeção anterior ou anticorpos vacinais, pelo que a comparação dos resultados obtidos entre MAT e ELISA é importante para tirar conclusões (Picardeau 2013).

No entanto, a MAT apresenta numerosos inconvenientes. Com efeito, não permitir distinguir uma resposta vacinal de uma resposta devida a uma infeção natural, ainda que os títulos de anticorpos aglutinantes sejam geralmente inferiores após uma vacinação em comparação a uma infeção natural (Anderson *et al.* 2023), e que a vacinação produz geralmente um aumento de anticorpos contra múltiplos serovares enquanto a infeção natural leva à formação de anticorpos dirigidos contra um único serovar (Camart-Périeré *et al.* 2012). Portanto, é importante ter acesso aos antecedentes vacinais dos animais testados. Além disso, podem ocorrer resultados falsos negativos, por exemplo no início da doença quando a seroconversão ainda não ocorreu (Anderson *et al.* 2023), nos casos de portadores crónicos ou de abortos, nos quais o título de anticorpos pode ser suficientemente baixo para não ser detetável. Então, a ausência de resultado positivo não confirma a ausência de infeção. Pode ainda existir uma reactividade serológica cruzada entre os serovares e serogrupos, e um animal infectado possuir anticorpos contra o serovar infectante, que podem reagir de forma cruzada com outros serovares, geralmente a um nível inferior. Portanto, a serologia não permite identificar o serovar infectante durante uma infeção ou epidemia, e necessita o isolamento da leptospira. Nas regiões onde os serovares tinham sido bem identificados por isolamento, o exame serológico de um ou mais animais infectados pode sugerir o serovar infectante mas não pode identificá-lo definitivamente (OIE

2021). Além disso, o MAT é um teste trabalhoso e subjectivo que necessita de um nível elevado de competência técnica (Anderson *et al.* 2023). O MAT não permite confirmar o diagnóstico, mas permite apenas estabelecer um perfil serológico que, associado ao quadro clínico e às características epidemiológicas, permite orientar o médico veterinário para um diagnóstico (Camart-Périé *et al.* 2012).

b. DOSAGEM IMUNO-ENZIMÁTICA (ELISA)

O teste ELISA pode ser realizado para evidenciar anticorpos, para o qual diferentes preparações de antígenos podem ser utilizadas, tais como células inteiras ou preparações de proteínas da membrana externa (*Outer Membrane Proteins* - OMP). Os antígenos utilizados dirigem a especificidade da ELISA, e as OMP são muito reativas aos anticorpos dirigidos contra as espécies patogénicas, no entanto não têm valor epidemiológico (OIE 2021). Os testes ELISA IgM são frequentemente utilizados para o diagnóstico da leptospirose aguda por serem mais rapidamente detetados do que com o MAT (Picardeau 2013). Outros testes ELISA foram desenvolvidos para que o diagnóstico fosse realizado sobre amostras de leite de vacas individuais ou diretamente no leite de tanque, para detectar nomeadamente o serovar Hardjo. No entanto, os rebanhos vacinados para o serovar Hardjo mostraram resultados positivos aos diferentes testes ELISA.

Os testes ELISA utilizando OMP como antígenos não são usualmente utilizados no diagnóstico de infeções accidentais ainda que possam ser úteis. Desempenham um papel importante nos programas de vigilância contra as infeções crónicas, nos quais os bovinos naturalmente infetados produzem uma fraca resposta ou nula às OMP, mas onde a principal resposta serológica é perante os antígenos LPS (OIE 2021). Portanto, embora o teste ELISA apresente vantagens em comparação ao MAT, não é frequentemente utilizado no diagnóstico da leptospirose por não fornecer resultados específicos ao serovar. Com efeito, um resultado positivo não fornece indicação quanto ao serovar ou ao serogrupo, e não é suficiente para diagnosticar a doença. O resultado deve ser confirmado por MAT, PCR ou por cultura (Picardeau 2013).

D. NECRÓPSIA

Por outro lado, as necrópsias dos indivíduos mortos, fetos abortados ou natimortos fornecem informações e permitem realizar amostragens. Nos fetos abortados, as lesões observadas não são geralmente específicas, mas a principal lesão observável é geralmente uma icterícia subcutânea (Camart-Périé *et al.* 2012). Também em fetos abortados posteriormente à inoculações experimentais com *L. borgpetersenii* serovar Hardjo tipo bovis, foi encontrado o mesmo tipo de lesões. Após uma série de abortos ictericos no sul da

Bélgica em 2014, Grégoire *et al.* (2020) observaram como principal lesão uma icterícia generalizada em fetos abortos, bem como um fígado com cor de cobre e uma esplenomegália. Estas lesões foram associadas a resultados serológicos e bacteriológicos positivos à *Leptospira*. Contudo, estas lesões não foram patognomónicas e dependem do estado de conservação do cadáver. Além disso, um edema hemorrágico generalizado observou-se em alguns fetos abortados, mas nenhum serovar específico foi associado a este tipo de lesão. Esta lesão foi associada a títulos de anticorpos elevados nas mães, sugerindo um fenómeno hiperagudo. Outras lesões foram observadas também, como petéquias e equimoses nos órgãos internos. Os testes serológicos foram realizados a partir de fluidos pleurais fetais e de soros das mães, e diferentes serogrupos foram identificados em proporções diferentes, como Grippotyphosa, Australis, Ballum, Icterohaemorrhagiae, Autumnalis, Bataviae, Pyrogenes e Tarassovi. Estes resultados serológicos positivos não foram atribuídos à vacinação, pois nenhuma vacina para bovinos é comercializado em Bélgica. O diagnóstico molecular permitiu identificar duas genospecies envolvidas nos abortos : *L. interrogans* e *L. kirschneri* (Grégoire *et al.* 2020). Igualmente, no caso de abortos relacionados à infecção por serovar Pomona, os cotilédones podem tomar uma coloração amarelada (Camart-Périer *et al.* 2012).

No caso duma infecção aguda num animal adulto, a necropsia pode revelar várias lesões, como uma icterícia generalizada, hemorragias múltiplas, bem como petéquias distribuídas na pele, nas mucosas e serosas. Os músculos esqueléticos podem apresentar um aspecto de carne cozida, nomeadamente nos membros posteriores. O fígado pode ser de tamanho normal ou levemente hipertrofiado, e apresenta geralmente uma cor mais pálida e amarelada. A vesícula biliar pode ser distendida e constituída por bÍlis pastosa e preta. Os rins podem apresentar-se inchados, hipertrofiados e congestionados, com uma superfície renal heterogénea e uma cor variando do castanho escuro ao preto nas zonas necróticas. As lesões renais resultam dos danos directos das leptospiras nas células endoteliais dos vasos sanguíneos durante a fase de leptospiremia, da hipóxia seguindo aos danos do endotélio e da hemólise. Podem resultar também dos danos do epitélio tubular causados pela hemoglobina e pela nefrite intersticial (Callan 2015). A bexiga pode ser distendida e conter uma urina escura. O baço pode ser ictérico e levemente hipertrofiado. Nos casos de pneumonia, os pulmões apresentam placas hemorrágicas (Camart-Périer *et al.* 2012), e edemas e enfisemas também podem ser observados. Úlceras e hemorragias podem ser visíveis na mucosa abomasal. Histologicamente, pode observar-se uma nefrite intersticial focal ou difusa, uma necrose hepática centrolobular e, em alguns casos, lesões vasculares nas meninges e no encéfalo durante infeções subagudas ou crónicas. Nos casos crónicos, a principal característica é a observação duma nefrite intersticial progressiva manifestando-se

por pequenos focos corticais brancos, inicialmente sobrelevados mas acabando por tornar-se levemente deprimidos à medida que a lesão persiste (Adugna 2016).

VI. TRATAMENTO

A. ANTIBIOTERAPIA

O objectivo principal da antibioterapia é de obter uma cura clínica e/ou bacteriológica, de forma a diminuir o risco dos animais ficarem portadores renais crónicos e excretarem as leptospiros pela urina, bem como de lutar contra o desenvolvimento de lesões renais e hepáticas responsáveis pela morte dos bovinos durante a doença aguda. *In vitro*, as leptospiros são sensíveis a diferentes famílias de antibióticos. Contudo, a sensibilidade *in vivo* e *in vitro* podem ser diferentes e estar relacionadas com a dificuldade de algumas moléculas atingirem concentrações eficazes nos rins, como os macrólidos. O antibiótico de eleição para o tratamento da doença aguda é a dihidroestreptomicina, com dosagem 12 mg/Kg por via IM, duas vezes por dia e durante três dias (Adugna 2016), ou na dose de 25 mg/Kg IM, uma vez por dia durante três dias (Camart-Périé *et al.* 2012). Permite também lutar contra a colonização renal e reduz a leptospiúria por difusão e concentração nos rins, mas parece pouco provável que atinga concentrações terapêuticas eficazes no trato reprodutivo (Bautista *et al.* 2022). Este antibiótico pode ser utilizado sozinho ou em associação com penicilinas ou tetraciclins. A penicilina G pode ser utilizada com dosagem 6 milhões UI/dia, durante uma semana no mínimo, e devem ser repetidas injeções em cada quatro horas para melhorar sua eficácia. Porém, a penicilina G é conhecida por causar reações alérgicas, e a utilização de dihidroestreptomicina é preferível. Igualmente, a amoxicillina mostrou resultados satisfatórios no tratamento contra o serovar Hardjo, com dosagem 15 mg/Kg IM, duas injeções com 48 horas de intervalo (Camart-Périé *et al.* 2012). Além disto, outras moléculas mostraram ser úteis na diminuição da leptospiúria, nomeadamente a oxitetraciclina de longa duração, com 20 mg/Kg IM numa só injeção (Camart-Périé *et al.* 2012) ou em duas injeções com 10 dias de intervalo (Callan 2015). O ceftiofur na dose de 20 mg/Kg IM, durante três dias, a tilmicosina 10 mg/Kg SC numa só injeção (Camart-Périé *et al.* 2012) e a tulatromicina 2,5 mg/Kg SC numa só injeção, também tinham sido eficazes na *clearance* das leptospiros ao nível renal e na redução da leptospiúria (Callan 2015). As fluoroquinolonas não são recomendadas no tratamento da leptospirose bovina, pois, apesar de terem poucos efeitos indesejados, devem ser utilizadas durante a fase de leptospiremia e parece que estas moléculas atingem concentrações inferiores à concentração minimal inibitória (CMI) requerida nos tecidos. Isto parece pouco aplicável nos bovinos, por exprimir geralmente poucos ou nenhuns sinais clínicos durante esta fase, e por necessitarem de administração com grandes doses para atingir uma CMI eficaz nos tecidos. No entanto, a

forma cristalina da enrofloxacinina parece ser eficaz no tratamento da leptospirose bovina. A sua utilização com dosagem 15 mg/Kg IM uma vez por dia durante 5 dias provoca efeitos semelhantes à estreptomicina com dose de 25 mg/Kg, sem efeitos indesejados observados, sugerindo que seja possível uma cura bacteriológica com esta molécula (Bautista *et al.* 2022).

O tratamento antibiótico é ainda mais eficaz quanto mais cedo for implementado, pois é durante a fase de bacteriemia que ocorre durante os primeiros 12 dias após a infecção, que a ação dos antibióticos é mais eficiente. A utilização de antibióticos durante a fase imunitária não impede muitas vezes a excreção urinária das leptospirosas. Em teoria, por esta razão e pelas características epidemiológicas da doença, o tratamento de todos os animais do rebanho seria necessário. No entanto, o custo do tratamento, o risco de novas contaminações, o risco de desenvolvimento de antibioresistência e as perdas associadas ao intervalo de segurança na administração destes fármacos, devem ser considerados pelo criador antes do tratamento (Camart-Périer *et al.* 2012).

B. TRATAMENTO SINTOMÁTICO

O tratamento sintomático é importante por permitir sustentar as funções principais do indivíduo infetado. Consiste na aplicação de uma fluidoterapia para compensar as perdas hídricas e eletrolíticas, a administração de hepatoprotetores, de anti-hemorragicos e eventualmente dos corticosteróides na dose imunomoduladora. Em caso de anemia, a administração de vitaminas B pode ser útil por ter um papel importante na eritropoiese. A transfusão sanguínea pode ser considerada, particularmente nos animais com trombocitopenia (Camart-Périer *et al.* 2012), ou com anemia severa (Callan 2015). A estimulação da diurese deve ser considerada nos animais com hemoglobinúria ou com evidências de insuficiência renal aguda. A presença de azotémia renal justifica um prognóstico reservado pois significa que mais de 75% dos nefrónios estão afectados, e nestes casos, uma nefrite e uma fibrose intersticial crónica podem ocorrer após o tratamento da doença aguda (Callan 2015).

VII. PROFILAXIA

O controlo da leptospirose baseia-se na gestão do ambiente, na vacinação e na terapia antimicrobiana, no sentido de alcançar uma cura bacteriológica, uma diminuição do risco de transmissão dentro do rebanho, bem como na diminuição das perdas económicas.

A. PROFILAXIA MÉDICA

A vacinação é uma das principais medidas na prevenção de perdas produtivas e reprodutivas associadas à leptospirose, e é uma ferramenta chave nos programas de controlo e de erradicação da leptospirose. As vacinas comerciais para os animais são vacinas inativadas contendo células inteiras de uma ou mais espécies de *Leptospira* patogénicas inativadas, chamadas também bacterinas. O efeito protector das bacterinas é mediado pela indução de anticorpos opsonizantes contra LPS, e é específico dos serovares incluídos na preparação ou intimamente relacionados a estes (de Oliveira *et al.* 2021). As vacinas podem conter adjuvantes, principalmente hidróxido de alumínio (Wilson-Wender *et al.* 2021). Idealmente, os bovinos devem ser vacinados antes duma exposição eventual, e a vacinação deve ser repetida todos os anos. Um programma de vacinação bem-sucedido requer estudos epidemiológicos para avaliar a incidência de serovares circulantes numa determinação população (OIE 2021).

As estirpes vacinais são seleccionadas em função das condições epidemiológicas e dos serovares dominantes. Existem vacinas monovalentes e polivalentes. Nos Estados-Unidos, os animais adultos são usualmente vacinados contra os serovares Canicola, Grippotyphosa, Hardjo, Icterohaemorrhagiae e Pomona (Camart-Périeré *et al.* 2012). Estas vacinas induzem uma imunidade protectora contra uma infeção acidental por serovares não adaptados (Zuerner *et al.* 2011). Contudo, estas vacinas polivalentes parecem não impedir a colonização renal e as lesões associadas bem como a excreção urinária, nomeadamente após uma inoculação experimental de *L. borgpetersenii* serovar Hardjo tipo hardjobovis (Callan 2015). Na Europa, apenas as vacinas monovalentes são utilizadas e contêm o serovar Hardjo, correspondendo ao Spirovac® et Leptavoid® (Camart-Périeré *et al.* 2012). Em França, só o Spirovac® tem autorização para a colocação no mercado. É destinado a todos os animais de boa saúde, com idade superior a 4 semanas, incluindo os animais gestantes e/ou de carne, e consiste na administração de duas doses de 2 mL SC com 4-6 semanas de intervalo. Quando esta vacina é utilizada para prevenir uma infeção fetal, deve ser administrada pelo menos duas semanas antes do período de reprodução. Uma re-vacinação semestral ou anual com dose única é recomendada consoante o risco epidemiológico. Os animais vacinados apresentam melhores desempenhos reprodutivos, nomeadamente na taxa de fecundidade após a primeira inseminação (Camart-Périeré *et al.* 2012).

Inicialmente, pensava-se que a vacinação ofereceu uma imunidade no curto prazo, quase quatro meses. No entanto, Zuerner *et al.* (2011) mostraram que a inoculação de *L. borgpetersenii* serovar Hardjo em bovinos vacinados com vacinas monovalentes, 12 semanas e 12 meses após a vacinação, não impede a infecção. Mas foi observado que a vacinação permitiu limitar a colonização renal e reduzir a excreção urinária de leptospiras.

Além disto, demonstraram que os linfócitos conservaram uma memória imunológica um ano após a vacinação, com uma proliferação linfocitária significativamente aumentada após a infecção experimental.

B. METAFILAXIA

Durante um episódio abortivo epidémico provocado por *Leptospira*, uma metafilaxia deve ser considerada, particularmente se a pressão infecciosa é elevada. Dois protocolos antibióticos são possíveis neste caso, como a administração de 20 mg/Kg de oxitetraciclina de longa duração em duas ou três injeções por via IM ou SC, ou de dihidroestreptomicina na dose de 20 mg/Kg com 15 dias de intervalo. Os animais em risco, tais como os vitelos e as vacas devem ser tratadas em prioridade (Camart-Périé *et al.* 2012).

C. PROFILAXIA SANITÁRIA

As principais medidas de biossegurança tomadas durante uma epidemia de leptospirose num rebanho têm por objetivo a limitação das infeções acidentais. Quando os animais infetados por *Leptospira* são identificados, devem ser isolados do resto do rebanho para reduzir o risco de transmissão. Contudo, o isolamento de animais infetados é dificilmente realizável na prática, pois a maioria dos animais infetados são geralmente assintomáticos, e os testes serológicos são geralmente insuficientes para identificar os portadores crónicos. Os locais devem ser desinfetados com nitrato de cal ou soluções iodadas, e o saneamento dos locais de armazenamento dos alimentos e das fontes de água é também necessário, nomeadamente com utilização de cloro. Os animais devem ser afastados do ambiente potencialmente contaminado e das fontes de água em risco. É preferível que os animais bebem em tanques de água potável em vez das fontes de água naturais ou de águas paradas (Camart-Périé *et al.* 2012).

Em casos de abortos, a gestão dos fetos abortados, da placenta e das secreções genitais é também de grande importância e é necessário destruí-las. A cama em contato com as matérias orgânicas infectantes devem ser também eliminadas. A ou as vacas que abortaram devem ser isoladas das outras vacas. É importante prestar atenção aos animais selvagens à volta da exploração, que constituem um reservatório importante e significativo de leptospiros. O objectivo é limitar a pressão infecciosa no ambiente e diminuir a probabilidade de infecção. Igualmente, as campanhas de controlo de roedores e das populações de animais selvagens podem ser realizadas para reduzir a pressão infecciosa. Por outro lado, a gestão das águas usadas dentro dos estábulos com animais infetados é muito importante para limitar a transmissão da infecção. As zonas húmidas e os terrenos

pantanosos à volta da exploração devem ser drenados e as pastagens onde animais excretores passaram, devem ser saneados com o espalhamento de nitrato de cal, cianamido cálcio ou superfosfato (Camart-Périé *et al.* 2012).

Nos intercâmbios internacionais ou na introdução de novos animais no rebanho, é recomendado efectuar despistagens serológicas através da realização de dois testes de MAT com três semanas de intervalo. No entanto, pode mostrar-se difícil a sua realização pois não existe padronização das estirpes de *Leptospira* testadas nos testes MAT, e a grande variabilidade de antigénios testados em função dos laboratórios pode levar à não deteção dos animais infetados para os serogrupos testados. Um tratamento antibiótico pode ser efetuado, e neste caso pode ser necessário complementar os testes serológicos por outras técnicas de diagnóstico para evidenciar a presença ou não de leptospiros nos tecidos ou fluidos corporais. Contudo, quando todas estas medidas de biossegurança são tomadas sozinhas, podem ser insuficientes na prevenção de novas infeções, e os tratamentos antibióticos bem como a vacinação ao nível do rebanho devem ser considerados em complemento destas medidas para proteger os animais sãos de serem infectados e para reduzir o número de portadores renais crónicos. Isto permite reduzir as sequelas reprodutivas bem como as perdas económicas consequentes da doença (Camart-Périé *et al.* 2012).

CONCLUSÃO

A leptospirose é uma doença de distribuição mundial, podendo infectar a maioria dos mamíferos. Nos bovinos, a infecção pode manifestar-se por uma variedade de sinais clínicos, desde uma doença crónica silenciosa resultando em falhas reprodutivas e produtivas levando a perdas económicas significantes, até a uma doença aguda potencialmente fatal. A transmissão da doença ocorre geralmente por contato directo com animais infectados, ou indirectamente pelo ambiente ou pela alimentação contaminados. Muitas vezes subestimadas, a transmissão venérea desempenha um papel importante na epidemiologia da leptospirose. Os roedores e os animais selvagens são considerados como os principais vectores da doença, excretando as leptospiras pela urina para o ambiente. As bactérias podem sobreviver e ficar infecciosas durante longo períodos no ambiente, sobretudo no solo considerado como o habitat natural das leptospiras, sendo posteriormente libertadas dos solos durante episódios chuvosos e contaminando subsequentemente os cursos de águas e as fontes de água potável. A dificuldade reside na identificação dos animais portadores crónicos, responsáveis pela contaminação e pela infecção de novos animais. O exame clínico dos animais raramente permite estabelecer um diagnóstico fiável, pelo que eventualmente uma melhoria do diagnóstico passará pela utilização mais ampla das técnicas de PCR, ou da utilização de diversos métodos em conjunto. Os testes serológicos de diagnóstico da leptospirose actualmente utilizados são úteis para identificar infeções agudas mas apresentam algumas limitações, aumentando a probabilidade da doença não ser diagnosticada. A combinação de diferentes métodos de diagnóstico pode ser útil por aumentar a probabilidade de identificar animais infectados. O controlo da doença necessita da implementação de tratamentos antibióticos nos animais infectados, da gestão do ambiente contaminado e da aplicação de um plano de vacinação dos animais em risco para limitar as novas infeções e as consequências produtivas e económicas subsequentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aduña S. (2016). A Review of Bovine Leptospirosis. *European Journal of Applied Sciences*, 8 (6), 347-355. doi: 10.5829/idosi.ejas.2016.347.355
- Ai-Hua Sun, Xiao-Xiang Liu, Jie Yan. (2020). Leptospirosis is an invasive infectious and systemic inflammatory disease. *Biomedical Journal*, Volume 43, Issue 1, Pages 24-31, ISSN 2319-4170. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2019.12.002>
- Aliberti A., Blanda V., Di Marco Lo Presti V., Macaluso G., Galluzzo P., Bertasio C., Sciacca, C., Arcuri F., D'Agostino R., Ippolito D., et al. (2022). *Leptospira interrogans* Serogroup Pomona in a Dairy Cattle Farm in a Multi-Host Zootechnical System. *Vet. Sci.*, 9, 83. <https://doi.org/10.3390/vetsci9020083>
- Anderson T., Hamond C., Haluch A., Toot K., Nally J. E., LeCount K., Schlater L. K. (2023). Animals Exposed to *Leptospira* Serogroups Not Included in Bacterins in the United States and Puerto Rico. *Trop. Med. Infect. Dis.*, 8, 183. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8030183>
- André-Fontaine G., Nicholas D., Scalzo B., Keïta A., Nanjiani I. (2010). Prévalence sérologique de la leptospirose à *Leptospira* sérovar Hardjo chez les bovins femelles adultes en France en 2004. *Bulletin des GTV*. 55: 67–74
- Arent Z., Pardyak L., Dubniewicz K., Placono B. J., Kotula-Balak M. (2022). *Leptospira* taxonomy : then and now. *Med. Weter.*, 7(10), 489-496. doi :[dx.doi.org/10.21521/mw.6694](https://doi.org/10.21521/mw.6694)
- Ayral F. C., Bicot D. J., Pereira H., Artois M., Kodjo A. (2014). Short Report : Distribution of *Leptospira* serogroups in cattle herds and dogs in France. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 91(4), , pp. 756–759. doi:10.4269/ajtmh.13-0416
- Atxaerandio R., Aduriz G., Ziluaga I., Esteban J. I., Maranda L., Mainar-Jaime R. C. (2005). Serological evidence of *Leptospira interrogans* serovar Bratislava infection and its association with abortions in cattle in northern Spain. *Vet Rec.*, 156(12):376-80. doi: 10.1136/vr.156.12.376. PMID: 15816182
- Banfi E., Cinco M., Bellini M., Soranzo M. R. (1982). The role of antibodies and serum complement in the interaction between macrophages and leptospires. *J. Gen. Microbiol.*, 128, 813–816. <https://doi.org/10.1099/00221287-128-4-813>

- Barragan V., Olivas S., Keim P., Pearson T. (2017). Critical knowledge gaps in our understanding of environmental cycling and transmission of *Leptospira* spp. *Appl Environ Microbiol* 83:e01190-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.01190-17>
- Bautista J. M., Aranda Estrada M., Gutiérrez Olvera L., Lopez Ordaz R., Sumano López H. (2022). Treatment of Bovine Leptospirosis with Enrofloxacin HCl 2H₂O (Enro-C): A Clinical Trial. *Animals (Basel)*;12(18):2358. doi: 10.3390/ani12182358. PMID: 36139218. PMCID: PMC9495257
- Bielanski A., Surujballi O., Golsteyn T. E., Tanaka E. (1998). Sanitary status of oocytes and embryos collected from heifers experimentally exposed to *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjobovis. *Anim Reprod Sci.*;54(2):65-73. doi: 10.1016/s0378-4320(98)00145-6. PMID: 9877053
- 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): e0227055. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227055>
- Bonhomme D., Santecchia I., VernelPauillac F., Caroff M., Germon P., Murray G., et al. (2020) Leptospiral LPS escapes mouse TLR4 internalization and TRIF-associated antimicrobial responses through O antigen and associated lipoproteins. *PLoS Pathog* 16(8): e1008639. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008639>
- Bourhy P., Collet L., Brisse S., Picardeau M. (2014). *Leptospira mayottensis* sp. nov., a pathogenic species of the genus *Leptospira* isolated from humans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 64;12, pages 4061–4067. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.066597-0>
- Brenner D. J., Kaufmann A. F., Sulzer K. R., Steigerwalt A. G., Rogers F. C., and Weyant R. S.(1999). Further determination of DNA relatedness between serogroups and servers in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, pages 839-858. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-2-839>
- Bulla-Castañeda D. M., Buitrago H. A. L., Lancheros-Buitrago D. J., Díaz-Anaya A. M., Garcia-Corredor D. J., Tobón-Torreglosa J. C., Ortega D. O., Pulido-Medellín M. O. (2022). Seroprevalence and risk factors associated with the presence of bovine leptospirosis in the

municipality of Sotaquirá, Colombia. *Open Vet J.*; 12(5):668-675. doi: 10.5455/OVJ.2022.v12.i5.11. Epub 2022 Sep 14. PMID: 36589398; PMCID: PMC9789764

- Callan R. J. (2015). Leptospirosis. Diseases of the Renal System. *Large Animal Internal Medicine*. 5th Edition.
- Camart-Périé A., Legrand E. (2012). Leptospirose bovine : épidémiologie et aspects cliniques. *Le Point Vétérinaire*, N°330, pages 64-69
- Casanovas-Massana A., Pedra G. G., Wunder E. A., Jr, Diggle P. J., Begon M., Ko A.I. (2018). Quantification of *Leptospira interrogans* survival in soil and water microcosms. *Appl Environ Microbiol* 84:e00507-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.00507-18>
- Chideroli R. T., Gonçalves D. D., Suphoronski S. A., Alfieri A. F., Alfieri A. A., de Flo A. G., de Freitas J. C. et Pereira U. P. (2017). Culture Strategies for Isolation of Fastidious *Leptospira* Serovar Hardjo and Molecular Differentiation of Genotypes Hardjovis and Hardjoprajitno. *Devant. Microbiol* . 8:2155. doi : 10.3389/fmicb.2017.02155
- Costa F., Hagan J.E., Calcagno J., Kane M., Torgerson P., Martinez-Silveira M.S., Stein C., Abela-Ridder B., Ko A.I. (2015). Global morbidity and mortality of leptospirosis: A systematic review. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 9, e0003898.
- de Oliveira N. R., Jorge S., M. Andrade Colares Maia et al. (2021). Protective efficacy of whole-cell inactivated *Leptospira* vaccines made using virulent or avirulent strains in a hamster model. *Vaccine* 39, 5626-5634. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.08.014>
- Di Azevedo M. I. N., Lilenbaum W. (2021). An overview on the molecular diagnosis of animal leptospirosis, *Letters in Applied Microbiology*, Volume 72, Issue 5, 1, Pages 496–508, <https://doi.org/10.1111/lam.13442>
- Eaglesome M. D., Garcia M. M. (1997). Disease risks to animal health from artificial insemination with bovine semen. *Scientific & Technical Review.*;16(1): 215-225. doi: <http://dx.doi.org/10.20506/rst.16.1.1017>
- Evangelista K. V., Coburn J. (2010). *Leptospira* as an emerging pathogen : a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiol*; 5(9):1413-1425. doi:10.2217/fmb.10.102

- Ferreira A. S., Ahmed A., Rocha T., Vieira M. L., Paiva-Cardoso M. das N., Mesquita J. R., et al. (2020). Genetic diversity of pathogenic leptospires from wild, domestic and captive host species in Portugal. *Transbound Emerg Dis.*;67(2): 852–864. doi: 10.1111/tbed.13409
- Fontana C., Lambert A., Benaroudj N., Gasparini D., Gorgette O., Cachet N., et al. (2016) Analysis of a Spontaneous Non-Motile and Avirulent Mutant Shows That FliM Is Required for Full Endoflagella Assembly in *Leptospira interrogans*. *PLoS ONE*;11(4): e0152916. doi:10.1371/journal.pone.0152916
- Grégoire F., Bakinahe R., Petitjean T., Boarbi S., Delooz L., Fretin D., Saulmont M., Mori M. (2020). Laboratory Diagnosis of Bovine Abortions Caused by Non-Maintenance Pathogenic *Leptospira* spp.: Necropsy, Serology and Molecular Study Out of a Belgian Experience. *Pathogens.*; 9(6):413. <https://doi.org/10.3390/pathogens9060413>
- Grippi F., Giudice E., Pietro S. D., Sciacca C., Santangelo F., Galluzzo P., Barreca S., Guercio A. (2020). *Leptospira Interrogans* Serogroup Sejroe Serovar Hardjo in Aborting Cows: Two Herd Cases in Sicily (Italy). *J Vet Res.*;64(1):73-78. doi: 10.2478/jvetres-2020-0021. PMID: 32258802; PMCID: PMC7106001
- Guedes I. B., de Souza Rocha K., Negrão M. P., de Souza G. O., de Paula Castro J. F., Cavalini M. B., de Souza Filho A. F., Neto M. S. D., Aizawa J., de Moraes C. C. G., Heinemann M. B. (2020). *Leptospira* transport medium (LTM) : a practical tool for leptospira isolation. *Journal of Microbiological Methods*, Volume 175. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105995>
- Guernier V., Goarant C., Benschoop J., Lau C. L. (2018). A systematic review of human and animal leptospirosis in the Pacific Islands reveals pathogen and reservoir diversity. *PLoS Negl Trop Dis*; 12(5): e0006503. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006503>
- 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*; 13(4): e0007374. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007374>
- Hartmann K., Egberink H., Pennisi M. G., Lloret A., Addie D., Belak S., et al. (2013). *Leptospira* species infection in cats: ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg.*; 15: 576–581. doi: 10.1177/1098612X13489217 PMID: 23813819

- Iraola G., Spangenberg L., Lopes B. B., Graña M., Vasconcelos L., Almeida Á., Greif G., Robello C., Ristow P., Naya H. (2016). Transcriptome Sequencing Reveals Wide Expression Reprogramming of Basal and Unknown Genes in *Leptospira biflexa* Biofilms. *mSphere*;1(2):e00042-16. doi: 10.1128/mSphere.00042-16. PMID: 27303713; PMCID: PMC4863578
- Ko AI, Goarant C, Picardeau M (2009) *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Micro* 7: 736-747,doi:10.1038/nrmicro2208
- Legrand E. (2007). La leptospirose bovine. Thèse de doctorat vétérinaire, ENVA.
- Lehmann J. S., Matthias M. A., Vinetz J. M., Fouts D. E. (21014). Leptospiral pathogenomics. *Pathogens*.;3(2):280-308. doi: 10.3390/pathogens3020280. PMID: 25437801; PMCID: PMC4243447.
- Levett P. N. (2001). Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*,Volume 14, Issue 2, pages 296-326. https://doi.org/10.1128/CMR.14.2.296-326.2001open_in_new
- Levett P. N., Morey R. E., Galloway R., Steigerwalt A. G., Ellis W. A. (2005). Reclassification of *Leptospira parva* HovindHougen et al. 1982 as *Turneriella parva* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 1497-1499. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63088-0>
- Levett P. N., Morey R. E., Galloway R. L. & Steigerwalt A. G. (2006). *Leptospira broomii* sp. nov., isolated from humans with leptospirosis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 56, 671–673
- Loureiro A. P., Lilenbaum W.(2020). Leptospirose bovine génitale : Un nouveau regard pour une vieille maladie. *Thériogénologie*;141:41–47. doi : 10.1016/j.theriogenology.2019.09.011
- Loureiro A. P., Martins G., Pinto P., Narduche L., Teixeira R. C., Lilenbaum W. (2015). Usage of a selective media (EMJH-STAFF) in primary culturing of pathogenic leptospires from bovine clinical samples. *Lett Appl Microbiol*.;61(6):603-6. doi: 10.1111/lam.12501. Epub 2015 Nov 2. PMID: 26408270
- Matthias M. A., Ricaldi J. N., Cespedes M., Diaz M. M., Galloway R. L., Saito M., Steigerwalt A. G., Patra K. P., Ore C. V. & other authors (2008). Human leptospirosis

caused by a new, antigenically unique *Leptospira* associated with a *Rattus* species reservoir in the Peruvian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis* 2, e213. doi : 10.1371/journal.pntd.0000213

- Mohammed H., Nozha C., Hakim K., Abdelaziz F., Rehia B. (2011). *Leptospira* : Morphology, Classification and Pathogenesis. *Journal of Bacteriology and Parasitology*, Vol 2, Issue 6. doi: 10.4172/2155-9597.1000120
- Molinari P. C. C., Nally J. E., Bromfield J. J. (2021). Bovine endometrial cells do not mount an inflammatory response to *Leptospira*. *Reprod Fertil*.;2(3):187-198. doi: 10.1530/RAF-21-0012. PMID: 35118389; PMCID: PMC8801031
- Mwachui M. A., Crump L., Hartskeerl R., Zinsstag J., Hattendorf J. (2015). Environmental and Behavioural Determinants of Leptospirosis Transmission: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis* 9(9): e0003843. doi:10.1371/journal.pntd.0003843
- Nakamura, S. (2022). Motility of the Zoonotic Spirochete *Leptospira*: Insight into Association with Pathogenicity. *Int. J. Mol. Sci.*, 23, 1859. [https://doi.org/ 10.3390/ijms23031859](https://doi.org/10.3390/ijms23031859)
- OIE, 2021. Leptospirosis. Terrestrial Manual 2021, Chapter 3. 1. 12.
- Ozuru R, Saito M, Kanemaru T, Miyahara S, Villanueva SYAM, Murray GL, et al. (2017) Adipose tissue is the first colonization site of *Leptospira interrogans* in subcutaneously infected hamsters. *PLoS ONE* 12(2): e0172973. doi:10.1371/journal.pone.0172973
- Pappas G. Papadimitriou P., Siozopoulou V., Christou L., Akritidis N. (2008). The globalization of leptospirosis : worldwide incidence trends. *International Journal of Infectious Disease*, 12, 351-357. doi:10.1016/j.ijid.2007.09.011
- Perolat P., Chappel R. J., Adler B., Baranton G., Bulach D. M., Billingham M. L., Letocart M., Merien F., and Serrano. M. S. (1998). *Leptospira fainei* sp. nov., isolated from pigs in Australia. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48, pages 851-858. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-3-851>
- Picardeau, M. (2013). Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Médecine et maladies infectieuses*, 43, 1–9

- Picardeau M. (2017). Virulence of the Zoonotic Agent of Leptospirosis: Still Terra Incognita? *Nature Reviews. Microbiology*, mars. doi:10.1038/nrmicro.2017.5
- Piredda I., Sechi S., Cocco R., Bertoldi L., Palmas B., Chisu V. (2022). Isolation of *Leptospira interrogans* Serovar Canicola in a Vaccinated Dog without Clinical Symptoms. *Pathogens*;11(4):406. doi: 10.3390/pathogens11040406. PMID: 35456081; PMCID: PMC9028210
- Puche R., Ferrés I., Caraballo L., Rangel Y., Picardeau M., Tarif H. & Iraola G. (2018). *Leptospira venezuelensis* sp. nov., a new member of the intermediate group isolated from rodents, cattle and humans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 68:513-517. doi 10.1099/ijsem.0.002528
- Ramadass P., Jarvis B. D. W., Corner R. J., Cinco M., Marshall R. B. (1990). DNA Relatedness among strains of *Leptospira biflexa*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Vol 40, No 3, pages 231-235. <https://doi.org/10.1099/00207713-40-3-231>
- Ramadass P., Jarvis B. D. W., Corner R. J., Penny, D. & Marshall R. B. (1992). Genetic characterization of pathogenic *Leptospira* species by DNA hybridization. *International Journal of Systematic Bacteriology* , 42, pages 215-219. <https://doi.org/10.1099/00207713-42-2-215>
- Ratet G., Veyrier F. J., Fanton d'Andon M., Kammerscheit X., Nicola M. A., Picardeau M., Boneca I. G., Werts C. (2014). Live imaging of bioluminescent *Leptospira interrogans* in mice reveals renal colonization as a stealth escape from the blood defenses and antibiotics. *PLoS Negl Trop Dis*;8(12):e3359.<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003359>
- Ristow P., Bourhy P., Kerneis S., Schmitt C., Prevost M. C., Lilenbaum W., Picardeau M. (2008). Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. *Microbiology*, 154, 1309–1317, <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/014746-0>
- Rodrigo Rezende Mires de Carvalho, Carla Silva Dias, Lucas Nogueira Paz, Thainá Melo de Lima Fires, Cláudio Pereira Figueira, Karine Araújo Damasceno, Melissa Hanzen Pinna. (2023). Biofilm formation in vitro by *Leptospira interrogans* strains isolated from naturally infected dogs and their role in antimicrobial resistance. *Heliyon*, Volume 9, Issue 3, e13802, ISSN 2405-8440, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e13802>

- Ryan E. G., Leonard N., O'Grady L., More S. J., Doherty M. L. (2012). Seroprevalence of *Leptospira* Hardjo in the Irish suckler cattle population. *Irish Veterinary Journal*;65:8. doi:10.1186/2046-0481-65-8
- Saito M., Villanueva S. Y., Kawamura Y., Iida K., Tomida J., Kanemaru T., et al. (2013). *Leptospira idonii* sp. nov., isolated from environmental water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(Pt 7), pages 2457–2462. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.047233-0>
- Samrot, A. V., Sean, T. C., Bhavya, K. S., Sahithya, C. S., Chan-drsekaran, S., Palanisamy, R., Robinson E. R.; Subbiah, S. K., Mok P. L. (2021). Leptospiral Infection, Pathogenesis and Its Diagnosis—A Review. *Pathogens*, 10, 145. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020145>
- Santos A. A. N., Ribeiro P. S. , da França G. V., Souza F. N., Ramos E. A. G., Figueira C. P., et al. (2021). *Leptospira interrogans* biofilm formation in *Rattus norvegicus* (Norway rats) natural reservoirs. *PLoS Negl Trop Dis*; 15(9): e0009736. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009736>
- Slack A. T., Kalambaheti T., Symonds M. L., Dohnt M. F., Galloway R. L., Steigerwalt A. G., Chaicumpa W., Bunyaraksyotin G., Craig S. & other authors (2008). *Leptospira wolffii* sp. nov., isolated from a human with suspected leptospirosis in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*;58, 2305–2308. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64947-0>
- Slack A. T., Khairani-Bejo S., Symonds M. L., Dohnt M. F., Galloway R. L., Steigerwalt A. G., Bahaman A. R., Craig S., Harrower B. J. & Smythe L. D. (2009). *Leptospira kmetyi* sp. nov., isolated from an environmental source in Malaysia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 59, 705–708. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.002766-0>
- Smythe L., Adler B., Hartskeerl R. A., Galloway R. L., Turenne C. Y. & Levett P. N. (2013). Classification of *Leptospira* genomospecies 1, genomospecies 3, genomospecies 4 and genomospecies 5 as *Leptospira alstonii* sp. nov., *Leptospira vanthiellii* sp. nov., *Leptospira terpstrae* sp. nov., *Leptospira yanagawae* sp. nov., respectively. *Int J Syst Evol Microbiol*;63, 1859–1862. doi:10.1099/ijs.0.047324-0

- Steinparzer R., Mair T., Unterweger C., Steinrigl A., Schmoll F. (2021). Influence of Selective Agents (EMJH-STAFF), Sample Filtration and pH on *Leptospira interrogans* Serovar Icterohaemorrhagiae Cultivation and Isolation from Swine Urine. *Vet Sci.*;8(6):90. doi: 10.3390/vetsci8060090. PMID: 34070655; PMCID: PMC8226611
- Sykes J. E., Reagan K. L., Nally J. E., Galloway R. L. et Haake D. A. (2022). Role of Diagnostics in Epidemiology, Management, Surveillance, and Control of Leptospirosis. *Pathogens*;11, no. 4 : 395. <https://doi.org/10.3390/pathogens11040395>
- Tagliabue S., Figarolli B. M., D'Incau M., Foschi G., Gennero M. S., Giordani R., Natale A., Papa P., Ponti N., Scaltrito D., et al. (2016). Serological surveillance of Leptospirosis in Italy: Two year national data (2010-2011). *Vet. Ital.*, 52, 129–138
- Thibeaux R., Girault D., Bierque E., Soupé-Gilbert M-E., Rettinger A., Douyère A., Meyer M., Iraola G., Picardeau M. and Goarant C. (2018). Biodiversity of Environmental *Leptospira*: Improving Identification and Revisiting the Diagnosis. *Front. Microbiol.* 9:816. doi: 10.3389/fmicb.2018.00816
- Tibary A. (2021). Abortion in Cattle. Reproductive System. *Merck Veterinary Manual*. <https://www.merckvetmanual.com/reproductive-system/abortion-in-large-animals/abortion-in-cattle?query=abortion%20in%20cattle#>
- Underwood W. J., Blauwiekel R., Delano M. L., Gillesby R., Mischler S. A., Schoell A. (2015). Biology and Diseases of Ruminants (Sheep, Goats, and Cattle), Chapter 15. Laboratory Animal Medicine (Third Edition), Pages 623-694, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409527-4.00015-8>
- Van den Brink K. M. J. A., Aalberts M., Fabri N. D., Santman-Berends I. M. G. A. (2023). Effectiveness of the *Leptospira* Hardjo Control Programme and Detection of New Infections in Dairy Cattle in The Netherlands. *Animals*.; 13(5):831. <https://doi.org/10.3390/ani13050831>
- Vincent A. T., Schiettekatte O., Goarant C., Neela V. K., Bernet E., Thibeaux R., et al. (2019). Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLoS Negl Trop Dis*;13(5): e0007270. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007270>

- Wilson-Welder J. H., Alt D. P., Nally J. E., Olsen S. C. (2021). Bovine immune response to vaccination and infection with *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo. *mSphere* 6:e00988-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00988-20>
- Wunder Jr E. A., Figueira C. P., Santos G. R., Lourdault K., Matthias M. A., Vinetz J. M., Ramos E., Haake D. A., Picardeau M., G. dos Reis M. & Ko, A. I. (2016). Real-time PCR reveals rapid dissemination of *Leptospira interrogans* after intraperitoneal and conjunctival inoculation of hamsters. *Infection and immunity*, 84(7), 2105-2115. <https://doi.org/10.1128/IAI.00094-16>
- Xu J., Koizumi N. and Nakamura S. (2020). Crawling Motility on the Host Tissue Surfaces Is Associated With the Pathogenicity of the Zoonotic Spirochete *Leptospira*. *Front. Microbiol.* 11:1886. doi: 10.3389/fmicb.2020.01886
- Yamaguchi T., Higa N., Okura N., Matsumoto A., Hermawan I., Yamashiro T., Suzuki T., Toma C. (2018). Characterizing interactions of *Leptospira interrogans* with proximal renal tubule epithelial cells. *BMC Microbiology*;18, 64. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1206-8>
- Yasuda P. H., Steigerwalt A. G., Sulzer K. R., Kaufmann A. F., Rogers F., and Brenner D. J., (1987). Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with proposals for seven new *Leptospira* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37, pages 407-415. <https://doi.org/10.1099/00207713-37-4-407>
- Zuerner R. L., ALT D. P., Palmer M. V., Thacker T. C., Olsen S. C. (2011). A *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo vaccine induces a TH1 response, activates NK cells, and reduces renal colonization. *Clinical and vaccine Immunology*, Vol 18, No 4, pages 684-691. doi:10.1128/CI.00288-10