





Seroepidemiologia de leptospirose em equinos da região de Santarém, Pará

Seroepidemiology of leptospirosis in horses from Santarém, Pará

Bruna Carolina Ulsenheimer¹ , Clarissa Luciano Barboza¹ , Emilie Oberbeck¹ , Rebeca Larissa Castro Silva² , Isadora Karolina Freitas de Sousa² , Ana Eucares von Laer¹ , Alexandre Alberto Tonin^{1*} 

¹Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

²Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM), Campus Manaus Zona Leste, Manaus, Amazonas, Brasil.

*Autor para correspondência: alexandre.tonin@ufsm.br

Resumo

Leptospira spp. é a bactéria causadora da leptospirose, uma doença endêmica, distribuída mundialmente, de caráter zoonótico responsável por gerar impacto sanitário e também econômico. Esse microrganismo, com característica espiralada, infecta mamíferos, dentre eles, os equinos. Estes animais, podem apresentar a doença na forma assintomáticos ou clínica. Desta forma, o atual estudo objetivou analisar amostras equinas na região de Santarém- Pará. Analisou-se 88 amostras de animais que não apresentavam histórico de vacinação contra a leptospirose, através da técnica da Microaglutinação Microscópica (MAT), utilizando um painel de 13 sorovares, pertencentes a dez diferentes sorogrupos. Desses animais, 58 foram soropositivos (65,90%), distribuídos em 28 (48,3%) amostras soro reagentes para Pyrogenes, 24 (41,4%) para Autumnalis, 18 (31%) para Icterohaemorrhagiae e 16 (27,6%) para Grippotyphosa. Mesmo não havendo suspeita de leptospirose, os animais apresentaram diferentes frequências sorológicas. Considerando-se o conhecido impacto da leptospirose na saúde humana e animal, nossos resultados apontam que é de suma importância estabelecer medidas de prevenção para reduzir perdas econômicas e não oferecer riscos à saúde pública.

Palavras-chave: *Leptospira* spp.; equídeos; epidemiologia; saúde pública; Pará.

Abstract

Leptospirosis is an endemic zoonotic disease that is distributed worldwide, which has the potential to have health and economic impacts. *Leptospira* spp. is spiral-shaped and capable of infecting mammals, including horses, which may result in asymptomatic or clinical forms. Therefore, the current study aimed to analyze the frequency of anti-*Leptospira* antibodies in serum samples from horses from Santarém, Pará, Brazil. For that purpose, 88 blood samples from horses without a history of leptospirosis vaccination were serologically evaluated through the microscopic agglutination technique (MAT) with a 13 serovars, belonging to ten different serogroups. There were 58 samples that were seropositive (65.90%), which included 28 samples seropositive for Pyrogenes (48.3%), 24 for Autumnalis (41.4%), 18 for Icterohaemorrhagiae (31.0%), and 16 for Grippotyphosa (27.6%). Even without clinical suspicion of leptospirosis or a history of vaccination, the horses showed different frequency of seropositivity. Considering the well-known impact of leptospirosis in human and animal health, our results are important to establish preventive measures to reduce the economic loss in equine production as well as a reduction in public health risk.

Keywords: *Leptospira* spp.; horses; epidemiology; public health; Pará.

1. Introdução

A leptospirose é uma doença bacteriana, zoonose que afeta mamíferos domésticos, silvestres e o homem^(1,2). Apresenta alta distribuição mundial e considerável impacto econômico e à saúde pública⁽³⁾. Existem mais de 260 sorovares identificados, cada um com seu(s) hospedeiro(s) preferido(s) que podem abrigar um ou mais sorovares⁽⁴⁾.

Leptospira spp. podem ser encontrados em diferentes contextos epidemiológicos, como urbano, rural e silvestre⁽⁵⁾. Entre os mamíferos, os equinos podem desenvolver a doença de forma clínica ou assintomática; sua evolução pode ser uma doença aguda ou crônica⁽⁶⁾, podendo ser observado sinais clínicos como febre, anorexia e dificuldade respiratória. Além disso, icterícia, hematúria, aborto espontâneo, natimorto/potros prematuros, uveíte e

Recebido: 17 de dezembro de 2022. Aceito: 27 de fevereiro de 2023. Publicado: 4 de maio de 2023



Este é um artigo de Acesso Aberto distribuído sob os termos da Creative Commons Attribution License, que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o trabalho original seja devidamente citado.

<https://revistas.ufg.br/vet/index>

disfunção hepática e renal podem estar presentes^(7,8).

Em equinos, a leptospirose é causada principalmente pelos sorovares Bratislava e Icterohaemorrhagiae⁽⁸⁾, porém a prevalência pode variar de acordo com a região⁽⁹⁾. Nesse sentido, em alguns estudos realizados no norte do Brasil foi observado a soroprevalência de outros sorovares como Australis, Autumnalis e Pyrogenes, além de Bratislava e Icterohaemorrhagiae⁽¹⁰⁻¹²⁾. No entanto, no norte do Brasil, há poucos estudos sobre a atual prevalência de leptospirose em equinos. Portanto, nosso estudo teve como objetivo realizar um inquérito seroepidemiológico da leptospirose em equinos da região de Santarém-Pará, Norte do Brasil.

2. Material e métodos

As amostras deste estudo foram obtidas de 88 equinos criados em 15 propriedades rurais de Santarém-Pará, Norte do Brasil. As amostras de sangue foram coletadas por punção venosa usando tubos estéreis sem anticoagulante. Dos 88 animais, 51 eram machos e 37 fêmeas, com idade entre 2 e 16 anos, sem histórico recente de vacinação contra leptospirose. Amostras de soro foram testadas para anticorpos anti-*Leptospira* pelo teste de soroaglutinação microscópica (MAT)^(13,14), usando antígenos vivos cultivados em meio líquido Ellinghausen–McCullough–Johnson–Harris livre de contaminação ou auto-aglutinação, conforme recomendado pela Organização Mundial da Saúde⁽¹⁵⁾. A diluição de 1:100 foi usada como ponto de corte.

Um painel completo de 10 sorogrupos (incluindo 13 sorovares de referência) foi usado como antígeno de teste. Este painel incluiu: sorogrupo Sejroe (sorovar Hardjo [subtipo Hardjo-prajitno] e Wolffi), sorogrupo Grippotyphosa (sorovar Grippotyphosa), sorogrupo Canicola (sorovar Canicola), sorogrupo Icterohaemorrhagiae (sorovar Icterohaemorrhagiae e Copenhageni), sorogrupo Australis (sorovar Bratislava), sorogrupo Pomona (sorovar Pomona), sorogrupo Autumnalis (sorovar Butembo), sorogrupo Pyrogenes (sorovar Pyrogenes), sorogrupo Ballum (sorovar Ballum) e sorogrupo Tarassovi (sorovar Tarassovi).

Resumidamente, suspensões vivas de *Leptospira* spp. representando os 13 sorovares foram adicionadas à diluição em série das amostras de soro em uma placa de microtitulação (96 poços), incubadas à temperatura de 36 graus Celsius por 2 a 4 horas. A presença ou ausência de aglutinação foi determinada usando microscopia de campo escuro com aumento de 100x. Os títulos foram obtidos a partir da sequência de diluições e expressos como a maior diluição sérica que apresentou no mínimo 50% de aglutinação para

Leptospira spp.^(13,14).

Os dados foram registrados em planilhas Excel e posteriormente utilizados para análise descritiva dos dados por meio da utilização de tabelas de frequência. As médias foram comparadas por meio do teste qui-quadrado, com nível de significância estatística de 5% ($P > 0,05$). Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (Brasil), com o número de aprovação CEUA.008.02.1417.2404/2020.

3. Resultados

Das 88 amostras de soro, 58 (65,9%) foram soropositivas e 30 (34,1%) foram soronegativas. A soroprevalência para infecções únicas (considerando apenas 1 sorogrupo reagente) é apresentada na Tabela 1, e a Tabela 2 apresenta os resultados de infecções mistas, ou seja, soropositividade para mais de 1 sorogrupo.

Nos resultados de infecção única (Tabela 1), observa-se que a soroprevalência incluiu o sorogrupo Pyrogenes [28 cavalos (48,3%)], seguido pelo sorogrupo Autumnalis [24 cavalos (41,4%)], Icterohaemorrhagiae [18 cavalos (31,0%)], e Grippotyphosa [16 cavalos (27,6%)]. Da mesma forma para as infecções mistas, os sorogrupos para Pyrogenes, Autumnalis e Icterohaemorrhagiae foram predominantes e notadamente três cavalos (14,3%) foram soropositivos para o sorogrupo Icterohaemorrhagiae e sorovar Copenhageni. Não foram obtidas diferenças estatisticamente significativas quanto à infecção por sexo ou idade, com idade média de 8,5 anos.

Tabela 1. Soroprevalência de *Leptospira* spp. sorogrupos em infecções únicas (considerando apenas um sorogrupo) em amostras de soro equino de Santarém, Pará.

SOROGRUPO	SOROPOSITIVO (n)	SOROPOSITIVO (%)
Pyrogenes	28	48,3
Autumnalis	24	41,4
Icterohaemorrhagiae	18	31,0
Grippotyphosa	16	27,6
Ballum	13	22,4
Sejroe	12	20,7
Canicola	12	20,7
Tarassovi	9	15,5
Pomona	1	1,72
Australis	0	0

Tabela 2. Soroprevalência de *Leptospira* spp. sorogrupos em infecções mistas (considerando mais de um sorogrupo) em amostras de soro equino de Santarém, Pará.

SOROGROUPO	SOROPOSITIVO (n)	SOROPOSITIVO (%)
Pyrogenes	6	28,6
Autumnalis	10	47,6
Icterohaemorrhagia e Grippotyphosa	3 (todos pertencentes a sorovar Copenhageni)	14,3
Ballum	0	0
Sejroe	1 (Hardjo)	4,76
Canicola	0	0
Tarassovi	1	4,76
Pomona	0	0
Australis	0	0

4. Discussão

Nossos resultados demonstraram que 58 equinos (65,9%) foram soropositivos, indicando que esses animais tiveram contato direto ou indireto com *Leptospira* spp. Pesquisas realizadas na última década no Brasil mostraram uma variação considerável quanto à soroprevalência de leptospirose em equinos^(9,12). A frequência observada neste estudo (65,9%) foi semelhante à encontrada em estudos realizados no Estado do Paraná (Brasil), onde relataram 66,88% de soropositividade⁽¹⁶⁾. No entanto, outro inquérito realizado no Maranhão, região norte do Brasil, demonstrou 85% de frequência sorológica⁽⁶⁾.

Foi observada maior soroprevalência para os sorogrupos Pyrogenes (48,3%) e Autumnalis (41,4%), o que difere do que geralmente é observado em estudos sorológicos de equinos no Brasil, onde é observada alta frequência dos sorogrupos Bratislava e Icterohaemorrhagiae⁽⁸⁾. Em estudo realizado na Bahia, Nordeste do Brasil por Gomes et al.⁽¹⁷⁾ também observaram maior prevalência do sorogrupo Pyrogenes (24,0%), demonstrando a importância deste sorogrupo em inquéritos sorológicos de equinos em diferentes regiões brasileiras. Moraes et al.⁽¹¹⁾, no Pará, e Sousa et al.⁽¹²⁾, no Amazonas, também observaram, assim como neste estudo, alta prevalência do sorogrupo Pyrogenes em equinos, o que pode sugerir a manutenção desse sorogrupo em alguns animais domésticos ou silvestres da região amazônica. No exterior, também foi identificado o sorogrupo Pyrogenes, com maior soroprevalência em cavalos da Suíça⁽¹⁸⁾.

Dentro do sorogrupo Icterohaemorrhagiae, o sorovar Copenhageni apresentou predominância quando comparado ao sorovar Icterohaemorrhagiae, que geralmente não é o resultado mais frequentemente observado em equinos. No entanto, um estudo de

Hamond et al.⁽⁸⁾, no Rio de Janeiro, também relatou maior prevalência do sorovar Copenhageni em equinos. Na Holanda, Houwers et al.⁽¹⁹⁾ também encontraram uma grande predominância do sorogrupo Icterohaemorrhagiae em cavalos, o que sugere que a soropositividade nesses animais não foi decorrente da vacina, mas sim de uma maior exposição aos sorovares, e os cavalos desenvolveram leptospirose subclínica. Considerando os problemas de saúde pública no Brasil, os sorovares Icterohaemorrhagiae e Copenhageni estão relacionados aos casos mais graves de leptospirose em humanos⁽²⁰⁾, com aproximadamente 1% dos pacientes desenvolvendo a forma mais grave e sendo fatal em 1–5% desses pacientes⁽²¹⁾. Considerando que a infecção em humanos geralmente ocorre após contato direto ou indireto com a urina de um animal infectado⁽⁵⁾, a alta prevalência do sorogrupo Icterohaemorrhagiae em nosso estudo pode requerer atenção como um problema de saúde pública.

Nossos resultados, para uma única infecção, mostraram que 16 cavalos (27,5%) eram soropositivos para o sorogrupo Grippotyphosa, que geralmente está relacionado à contaminação ambiental, pois esse grupo é abrigado por animais silvestres⁽²²⁾ e acomete cavalos de forma incidental⁽²³⁾. A reação sorológica para esse sorogrupo reforça a provável infecção em equinos pelo contato com animais silvestres, uma vez que a região onde foi realizado nosso estudo apresentava ambientes adequados para animais silvestres e condições favoráveis para a sobrevivência e disseminação do agente infeccioso.

A soropositividade para o sorovar Ballum foi observada em 13 amostras (22,4%), enquanto os sorogrupos Sejroe e Canicola tiveram 12 soropositivos (20,7%) cada. Os resultados de soroprevalência para o sorovar Ballum são menos frequentes, e raramente foram identificados como o sorovar mais prevalente em estudos com equinos⁽²⁴⁾. No Brasil, há um estudo mostrando sua soroprevalência em 11,76% dos equinos do Rio Grande do Sul⁽²⁵⁾. As infecções em equinos causadas pelos sorogrupos Sejroe ou Canicola não são consideradas comuns na América Latina⁽²⁶⁾, mas a sororreatividade regional e internacional para esses sorogrupos foi relatada⁽²⁷⁻²⁹⁾. Títulos elevados, com título igual ou superior a 400, correlacionam-se com infecção aguda por leptospirose em equinos; entretanto, títulos baixos de 100 a 200 podem representar uma infecção crônica devido à curva após a soroconversão, ou uma infecção aguda precoce com curva ascendente de anticorpos (soroconversão)⁽³⁰⁾.

Vale ressaltar que existem fatores de risco da epidemiologia da leptospirose⁽²⁴⁾ e que esses fatores de risco podem ser diferentes nas diversas regiões do Brasil. Devido ao amplo território do norte do Brasil e à grande diversidade animal desta região pode proporcionar condições particulares, principalmente quanto aos reservatórios e condições ambientais para manutenção de

Leptospira spp.. Assim, é necessário estabelecer, avaliar, monitorar e atender a esses fatores de risco, bem como realizar estudos de campo nos reservatórios para poder fornecer medidas preventivas e, então reduzir os riscos a saúde como de equinos e de humanos.

5. Conclusão

Nosso estudo analisou equinos da região de Santarém-Pará, Brasil. Observou-se maior soroprevalência para os sorogrupos Pyrogenes e Autumnalis, diferente da sorologia geralmente observada em equinos no Brasil. Considerando a peculiaridade ambiental do norte do Brasil, os resultados podem ocorrer devido à manutenção desses sorogrupos por alguns animais domésticos ou silvestres da região amazônica.

Declaração de conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

Agradecimentos

Agradecemos à Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação Tecnológica do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM). O financiamento para a realização do estudo foi fornecido pelo IFAM por meio do Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e à Inovação Tecnológica (PADCIT) - Edital nº 001/2019-PPGI/IFAM e Edital nº 001/2018/PR-PPGI/IFAM.

Contribuições do autor

Conceituação: B. C. Ulsenheimer, C. L. Barboza, E. Oberbeck, A. E. Von Laer e A. A. Tonin. *Curadoria de dados:* B. C. Ulsenheimer, C. L. Barboza e E. Oberbeck. *Análise formal:* B. C. Ulsenheimer, R. L. C. Silva e I. K. F. de Sousa. *Metodologia:* C. L. Barboza e E. Oberbeck. *Investigação:* B. C. Ulsenheimer, C. L. Barboza, E. Oberbeck, R. L. C. Silva e I. K. F. de Sousa. *Visualização:* B. C. Ulsenheimer, R. L. C. Silva, I. K. F. de Sousa e A. E. Von Laer. *Recursos:* A. E. Von Laer e A. A. Tonin. *Gerenciamento do projeto:* A. A. Tonin. *Aquisição de financiamento:* A. E. Von Laer e A. A. Tonin. *Supervisão:* A. A. Tonin. *Validação:* A. A. Tonin. *Redação (rascunho original):* B. C. Ulsenheimer, C. L. Barboza, E. Oberbeck, R. L. C. Silva e I. K. F. de Sousa. *Redação (revisão e edição):* A. A. Tonin.

Referências

- Haake DA, Levett PN. Leptospirosis in humans. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2015;387:65-97. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_5
- Cilia G, Bertelloni F, Fratini F. Leptospira Infections in Domestic and Wild Animals. *Pathogens.* 2020;9(7):573. <https://doi.org/10.3390/pathogens9070573>
- Schneider MC, Jancloes M, Buss DF, Aldighieri S, Bertherat E, Najera P, et al. Leptospirosis: a silent epidemic disease. *Int J Environ Res Public Health.* 2013;10(12):7229-7234. <https://doi.org/10.3390/ijerph10127229>
- Browne ES, Callefe JLR, Jesus ERS, Zeppelini CG, Cremonese C, Costa F. A Systematic Review of the geographic distribution of pathogenic *Leptospira* serovars in the Americas, 1930-2017. *An Acad Bras Cienc.* 2022;94(3).
- Adler B, De La Peña-Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet. Microbiol.* 2010;140: 287-296. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.012>
- Bezerra DC. Pesquisa de aglutininas antileptospira em soros sanguíneos de aulinos (*Equus Asinus*) e de condutores de veículos de tração animal na cidade de São Luís, MA, Brasil. *Cienc. Anim. Bras.* 2010;11(4):931-937.
- Deano ACO, Souza MSB. Uveíte recorrente equina (cegueira da lua). *Cienc. Rural.* 2000;30(2):373-380.
- Hamond C, Martins G, Lawson-Ferreira R, Medeiros MA, Lilenbaum W. The role of horses in the transmission of leptospirosis in an urban tropical area. *Epidemiol Infect* 2012;141(1):33-35. <https://doi.org/10.1017/S0950268812000416>
- Neta EIB, de Brito Neto J, Aragão CPM, de Melo Leite AKR. Leptospirose em equino: Uma revisão. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal* 2016;10(4):841-857. <http://dx.doi.org/10.5935/1981-2965.20160069>
- Aguiar DM, Cavalcante GT, Lara MCCSH, Villalobos EMC, Cunha EMS, Okuda LH et al. Prevalência de anticorpos contra agentes virais e bacterianos em equídeos do município de Monte Negro, Rondônia, Amazônia Ocidental Brasileira. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2008;45(4):269-276.
- Moraes CCG, Kuroda RBS, Pinho APVB, Ywasaki F, Menezes AMC, Martins IV, et al. Pesquisa de anticorpos para sorovares de *Leptospira interrogans* patogênicas em equídeos criados na ilha de Algodão, Estado do Pará. *Rev. Bras. Cienc. Agrar.* 2010;53(2):188-194.
- Sousa IKF, Silva RLC, Sousa RS, Vieira CEM, Melo S, Quevedo GP, et al. Frequency of leptospirosis in horses in Manaus and metropolitan region in Amazonas State, Brazil. *Braz J Vet Anim Sci.* 2020;57(4):e172607.
- Cole JR, Sulzer CR, Pursell AR. Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test. *Appl Microbiol.* 1973;25(6):976-80.
- Galton MM, Sulzer CR, Santa Rosa CA, Fields MJ. Application of a microtechnique to the agglutination test for leptospiral antibodies. *Appl Microbiol.* 1965;13(1):81-5.
- World Health Organization – WHO. Leptospirosis. Geneva: WHO; 2012. Disponível em: http://www.wpro.who.int/media-centre/factsheets/fs_13082012_leptospirosis/en/. Acessado em: 25/03/2022.
- Hashimoto VY, Gonçalves DD, Silva FG, Oliveira RC, Alves LA, Reichmann P, et al. Occurrence of antibodies against *Leptospira* spp. in horses of the urban area of Londrina, Paraná, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.* 2007;49(5):327-330.
- Gomes AHB, Oliveira FCS, Cavalcanti LA, Conceição IR, Santos GR, Ramalho EJ, et al. Ocorrência de aglutininas antileptospira em soro de equinos no estado da Bahia. *Rev. Bras. de Saude e Prod. Anim.* 2007;8(3):144-151.
- Blatti S, Overesch G, Gerber V, Frey J, Hüsey D. Seroprevalence of *Leptospira* spp. in clinically healthy horses in Switzerland. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 2011;153(10):449-56. <https://doi.org/10.1024/0036-7281/a000247>
- Houwens DJ, Goris MGA, Abdoel T, Kas JA, Knobbe SS, van Dongen AM, et al. Agglutination antibodies against pathogenic *Leptospira* in healthy dogs and horses indicate common exposure and regular occurrence of subclinical infections. *Vet.*

Microbiol. 2011;148:449-451.

20. Ministério da Saúde. Guia de vigilância em saúde. Brasília: Ministério da Saúde; 2014:652. Disponível em: https://bvsmis.saude.gov.br/bvsmis/publicacoes/guia_vigilancia_saude_3ed.pdf. Acessado em: 13/03/2022.

21. Fiocruz- Instituto Oswaldo Cruz. Novo protocolo para leptospirose. Rio de Janeiro: IOC/ Fiocruz; 2013. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=1737&sid=32>. Acessado em: 15/03/2022.

22. Hamond C, Pinna MH, Martins G, Medeiros MA, Lilenbaum W. Infection by *Leptospira* spp. in Cattle in a Tropical Region, Rio de Janeiro, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2015;92(1):210-210.

23. Morais DA, Costa DF, Nunes BC, Santos CSAB, Alves CJ, Azevedo SS. Seroepidemiological survey for leptospirosis in equines from semiarid region of Paraíba state, Northeastern Brazil. *Semin Cienc Agrar.* 2019;40(5):2079-2086.

24. Bastiani MP, Lovato LT, von Laer AE, Pötter L, Rodrigues RO, Souza BC, et al. Occurrence of *Leptospira* spp. and factors associated with the infection in horses from a military contingent in the Rio Grande do Sul State, Brazil. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2021;58:e180884.

25. Hack JD, Mousquer MA, Ries AS, Dewes C, de Souza RP, Ferreira NO, et al. Soroprevalência de *Leptospira interrogans* e flaviviruses em equinos da cidade de Pelotas e região, no Rio Grande do Sul. *Science and Animal Health*, 2018; 6(3): 228-246. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n8-302>

26. Pinto PS, Libonati H, Lilenbaum W. A systematic review of leptospirosis on dogs, pigs, and horses in Latin America. *Trop. Anim. Health Prod.* 2017;49:231–238. <https://doi.org/10.1007/s11250-016-1201-1208>

27. Da Silva AS, Jaguezski AM, Laber IF, von Laer AE, Lovato LT, da Silva MO, et al. *Leptospira* spp. in horses in southern Brazil: Seroprevalence, infection risk factors, and influence on reproduction. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2020;73: 101552.

28. Finger MA, de Barros Filho IR, Leutenegger C, Estrada M, Ullmann LS, Langoni H, et al. Serological and molecular survey of *Leptospira* spp. among cart horses from an endemic area of human leptospirosis in Curitiba, southern Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 2014;56:473–476. <https://doi.org/10.1590/s0036-46652014000600003>

29. Vera E, Taddei S, Cavirani S, Schiavi J, Angelone M, Cabassi CS, et al. *Leptospira* seroprevalence in Bardigiano horses in Northern Italy. *Anim.* 2019;10(1):23. <https://doi.org/10.3390/ani10010023>

30. Meny P, Iglesias T, Menéndez C, Quintero J, Ríos C, Ashfield N, et al. Seroprevalence of anti-*Leptospira* antibodies in equines and associated workers-Isolation of *Leptospira interrogans* serogroup Canicola from equine urine. *Zoonoses Public Health.* 2022;69(5):526-536. <https://doi.org/10.1111/zph.12942>