

Investigação sorológica, molecular e anatomopatológica para leptospirose em ovinos (*Ovis aries*) procedentes de um biotério de criação

Serological, molecular and pathological investigation for leptospirosis in ovines (*Ovis aries*) coming from a vivarium creation

Investigación serológica, molecular y anatomopatológica para leptospirosis en ovinos (*Ovis aries*) procedentes de un bioterio de cría

Liliane Almeida Carneiro
Centro Nacional de Primatas, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS,
Ananindeua, Pará, Brasil

Hilma Lúcia Tavares Dias
Laboratório de Investigação e Diagnóstico de Enfermidades Animal,
Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil

Márcia de Nazaré Miranda Bahia
Seção de Criação e Produção de Animais de Laboratório, Instituto
Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil

Ana Roberta Fusco da Costa
Seção de Bacteriologia e Micologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS,
Ananindeua, Pará, Brasil

Washington Luiz Assunção Pereira
Laboratório de Investigação e Diagnóstico de Enfermidades Animal,
Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Pará, Brasil

RESUMO

O presente trabalho relata um surto de leptospirose ocorrido no plantel de ovinos criados com finalidade de fornecimento de sangue aos laboratórios para produção de meios de cultivos e de testes de fixação de complemento. Foram realizadas análises sorológica, molecular e histopatológica. A análise sorológica foi realizada em 12 amostras utilizando o teste de soroaglutinação microscópica com ponto de corte 100, para os sorovares *Leptospira Bataviae*, *L. Javanica*, *L. Panama*, *L. Hebdomadis*, *L. Castellonis*, *L. Icterohaemorrhagiae*, *L. Pyrogenes*, *L. Cynopteri*, *L. Serjoe*, *L. Australis*, *L. Wolffii*, *L. Copenhageni*, *L. Autumnalis*, *L. Pomona* e *L. Tarassovi*. O exame anatomopatológico foi realizado somente em um dos animais, o qual foi encontrado morto e as análises moleculares foram realizadas no sangue e na urina utilizando a técnica do qPCR. Foram reagentes ao diagnóstico sorológico 50% dos animais, sendo identificados os sorovares *L. Copenhageni* (1/100 e 1/200), *L. Castellonis* (1/200 e 1/200), *L. Icterohaemorrhagiae* (1/200) e *L. Cynopteri* (1/200). O animal necropsiado apresentou hemorragia, icterícia e hemoglobínúria. A análise molecular demonstrou três animais positivos em amostras de sangue e dois animais positivos em amostras de urina, não havendo positividade concomitante para um mesmo animal. A identificação dos sorovares *Icterohaemorrhagiae* e *Copenhageni* sugere a necessidade de estudos, visando o isolamento do agente na região e a caracterização de sua patogenicidade, visto que no Brasil estes são os principais agentes etiológicos dos casos de leptospirose em humanos.

Palavras-chave: *Leptospira*; Ovinos; Biotério.

INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma antropozoonose causada por bactérias do gênero *Leptospira* spp., que possui ocorrência em áreas urbanas e rurais. É uma doença que acomete o homem e a grande maioria dos animais

domésticos e selvagens. Atualmente são conhecidas 14 espécies patogênicas, sendo a mais importante *L. interrogans*¹. São mantidas na natureza principalmente nos mamíferos, embora já tenham sido isoladas de répteis, anfíbios, peixes, pássaros e invertebrados. Estes animais podem se tornar portadores das leptospirosas, albergando-as no aparelho urinário e eliminando-as pela urina para o meio ambiente, constituindo fonte de infecção para animais suscetíveis². Os principais reservatórios são os animais sinantrópicos domésticos e selvagens como *Rattus norvegicus* (ratazana ou rato de esgoto), *Rattus rattus* (rato de telhado ou rato preto) e *Mus musculus* (camundongo ou catita). Além de outros reservatórios de importância como os caninos, suínos, bovinos, equinos, ovinos e caprinos³. Segundo Ellis⁴, uma

Correspondência / Correspondence / Correspondencia:

Liliane Almeida Carneiro
Instituto Evandro Chagas/SVS/MS
Rodovia BR 316 km 7, s/n. Bairro: Levilândia
CEP: 67030-000 Ananindeua-Pará-Brasil
Tel.: +55 (91) 3213-0469
E-mail: lilianecarneiro@iec.pa.gov.br

grande quantidade de informação tem sido publicada a respeito da doença em bovinos; porém pouco se sabe sobre a leptospirose nos pequenos ruminantes.

Os animais domésticos menos suscetíveis são os ovinos, no entanto, sofrem com a infecção das leptospirosas, com evolução assintomática, em muitos casos, podendo, às vezes, ocorrerem surtos da doença com abortamento e até morte⁵.

Santa Rosa e Castro⁶ relataram pela primeira vez, no Brasil, a infecção por *Leptospira* sp. em ovinos no Estado de São Paulo, onde foi encontrada uma prevalência de 34%.

Diferentes métodos laboratoriais podem confirmar o diagnóstico, seja baseado na detecção de anticorpos, ou por métodos que revelam a presença do microrganismo ou do seu ácido nucleico^{7,8,9}. A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera o teste de soroprecipitação microscópica (SAM) com antígenos vivos como padrão ouro para o diagnóstico da leptospirose¹⁰. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) permite amplificar quantidades mínimas de DNA de *Leptospira* spp. em diversos tipos de amostras biológicas^{9,11}. Alguns casos de leptospirose clinicamente aparentes em ovinos têm sido associados principalmente às sorovarietades Pomona¹², Ballum, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Sejroe¹³ e Hardjo⁴.

O único que pode utilizar tecidos formolizados é o exame histopatológico (renais, placentários, pulmonares, hepáticos em casos de aborto), possuindo como desvantagem uma baixa sensibilidade e incapacidade de detectar a sorovarietade infectante¹⁴.

O presente estudo relata um surto de leptospirose ocorrido no plantel de ovinos, criados com finalidade de fornecimento de sangue aos laboratórios para produção de meios de cultivos e de testes de fixação de complemento.

MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo (parecer CEUA/IEC nº 001/2014) relata a ocorrência de surto de leptospirose na criação de ovinos do biotério da Seção de Criação e Produção de Animais de Laboratório do Instituto Evandro Chagas (IEC), órgão vinculado à Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (MS). A criação ficava na proximidade de uma área de mata preservada e possuía em seu entorno uma área residencial, o que facilitou a atração de roedores, tanto silvestres quanto sinantrópicos, devido à disponibilidade de restos alimentares na área de criação.

Somente após a morte de um exemplar dos ovinos e de um abortamento no mês anterior ao óbito resolveu-se proceder às investigações clínicas e laboratoriais sobre a *causa mortis* e do abortamento dos animais, no entanto os outros exemplares eram clinicamente assintomáticos.

Os espécimes clínicos avaliados incluíram amostras de sangue (n = 12) e urina (n = 9) dos 13 animais suspeitos. O diagnóstico da enfermidade foi realizado por meio de análise sorológica, molecular

e histopatológica; o teste de Soroprecipitação Microscópica (SAM) foi realizado conforme as recomendações do MS e da OMS^{9,11}. As amostras foram testadas com diluição variando de 1:100 até 1:6.400 e foram utilizados os seguintes sorovares para a prova de SAM: Australis, Autumnalis, Bataviae, Castellonis, Copenhageni, Cynopteri, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Panama, Pomona, Pyrogenes, Sejroe, Tarassovi e Wolffi.

O DNA das diferentes amostras foi extraído com o kit comercial QIAamp® DNA Mini Kits (QIAGEN, Austrália), de acordo com as instruções do fabricante. Alíquotas de 200 µL de água ultrapura foram usadas como controles negativos em cada procedimento de extração de DNA. Os ensaios de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) foram realizados de acordo com Stoddard et al¹⁵, com algumas modificações. A detecção de leptospirosas foi realizada pelo gene *lipL32*, presente apenas em espécies patogênicas, para amplificação do fragmento *lipL32* (242 pb) foram utilizados iniciadores LipL32-45F (5'-AAGCATTACCGCTTGTGGTG-3') e LipL32-286R (5'-GAACTCCATTTCAGCGATT-3'), em conjunto com a sonda de hidrólise LipL32-189P (5'-FAM-AAAGCCAGGACAAGCGCCG-MGB-3'). As amplificações foram realizadas no equipamento 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems®), utilizando o sistema TaqMan® PCR Master Mix (Applied Biosystems®). As reações foram executadas em duplicata para testar a reprodutibilidade do teste. Um controle negativo (água) e um positivo (*L. Icterohaemorrhagiae*) foram incluídos em todas as corridas de amplificação.

O exame anatomopatológico pós-morte foi realizado somente em um único animal, o qual foi encontrado morto, procedendo com o registro descritivo e documentação cadavérica. Após ser necropsiado, o cadáver foi acomodado em saco plástico adequado e encaminhado para incineração. Devido ao seu estado de autólise *post-mortem* não foram colhidas amostras biológicas para realização de exames complementares.

RESULTADOS

De 13 animais testados, cinco (38,4%) foram positivos por meio do qPCR utilizando amostras de sangue e urina e seis animais dos 12 testados pela SAM (50%) reagiram para um ou mais sorovares da *Leptospira* spp. Dentre os animais soro reagentes, o sorovar Castellonis foi o mais frequente com três soros reagentes (1/200 - 25%), seguido pelo Copenhageni com dois soros reagentes (1/100 e 1/200 - 16,6%) e um soro reagente ao sorovar Icterohaemorrhagiae (1/200 - 8,3%) e um reagente ao sorovar Cynopteri (1/200 - 8,3%).

Um animal apresentou sororreatividade a dois sorovares, Castellonis (1/200) e Cynopteri (1/200). A análise molecular detectou três animais positivos em amostras de sangue (23%) e dois animais positivos em amostras de urina (22,2%), não havendo positividade concomitante em um mesmo animal entre os espécimes clínicos (sangue e urina) segundo a análise molecular (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 – Resultados moleculares e sorológicos em amostras de sangue em ovino procedente de biotério de criação, com suspeita de leptospirose

Animal	Espécime clínico	qPCR (Sinal)	qPCR (Ct)	Imunoensaio (SAM)	Sorovar	Título
1	Sangue	Não detectável	–	Reagente	Castellonis	200
2	Sangue	Detectável	20,06	Não reagente		
3	Sangue	Detectável	24,21	Sem amostra	Sem amostra	
4	Sangue	Não detectável	–	Reagente	Castellonis	200
5	Sangue	Não detectável	–	Não reagente		
6	Sangue	Não detectável	–	Não reagente		
7	Sangue	Não detectável	–	Reagente	Copenhageni	100
8	Sangue	Não detectável	–	Reagente	Icterohaemorrhagiae	200
9	Sangue	Não detectável	–	Não reagente		
10	Sangue	Não detectável	–	Não reagente		
11	Sangue	Detectável	28,40	Reagente	Copenhageni	200
12	Sangue	Não detectável	–	Reagente	Castellonis, Cynopteri	200
13	Sangue	Não detectável	–	Não reagente		

Sinal convencional utilizado: – Dado numérico igual a zero não resultante de arredondamento.

Tabela 2 – Resultados moleculares em amostras de urina em ovino procedente de biotério de criação, com suspeita de leptospirose

Animal	Espécime clínico	qPCR (Sinal)	qPCR (Ct)
1	Urina	Não detectável	–
2	Urina	Sem amostra	Sem amostra
3	Urina	Sem amostra	Sem amostra
4	Urina	Não detectável	–
5	Urina	Sem amostra	Sem amostra
6	Urina	Sem amostra	Sem amostra
7	Urina	Não detectável	–
8	Urina	Detectável	25,89
9	Urina	Detectável	22,69
10	Urina	Não detectável	–
11	Urina	Não detectável	–
12	Urina	Não detectável	–
13	Urina	Não detectável	–

Sinal convencional utilizado: – Dado numérico igual a zero não resultante de arredondamento.

Para o qPCR tivemos uma amostra (Animal 2) que apresentou "threshold cycle" (Ct) 20,06, porém ao SAM foi não reagente, uma segunda amostra (Animal 3) que apresentou Ct 24,21, porém a amostra encaminhada estava hemolisada e não foi possível realizar a SAM e uma terceira amostra (Animal 11) que apresentou Ct 28,40 e resultado ao SAM o soro reagente ao sorovar Copenhageni (1/200) (Tabela 3).

Tabela 3 – Resultados moleculares em amostras de sangue em ovino procedente de biotério de criação, com suspeita de leptospirose

Identificação do Animal	SAM	Sorovar	qPCR (Ct)
2	Não reagente		20,06
3	Não realizada		24,21
11	Reagente	Copenhageni	28,40

No exame anatomopatológico pós-morte, observou-se que o animal apresentava boa condição corporal, além de sangramento nasal bilateral (Figura 1), sangue fluindo pela cavidade nasal e fezes com sangue no orifício anal (Figura 2). No exame interno, iniciado a partir da incisão mento-pubiana e rabatimento da pele, foi evidenciado edema na região dorsal. A gordura do subcutâneo mostrou-se de coloração amarelada (ictérica) (Figura 3). Na abertura da cavidade torácica evidenciou-se pequena quantidade de líquido de aspecto translúcido; no coração observou-se hemorragias epicárdicas, já com embebição hemolítica (*post-mortem*). Na abertura da cavidade abdominal, o omento também possuía uma coloração amarelada (ictérica); o fígado estava bastante autolisado com coloração amarelo-acastanhado; o baço mostrou leve aumento de tamanho (esplenomegalia) e os rins uma coloração mais escurecida (congestão) (Figura 4). A bexiga apresentava baixo volume urinário com coloração escurecida (aspecto marrom escuro).



Foto: Washington Luís Assunção Pereira

Figura 1 – Ectoscopia necroscópica de ovino procedente de biotério de criação com suspeita de leptospirose, apresentando sangramento nasal bilateral



Foto: Washington Luis Assunção Pereira

Figura 2 – Fezes escuras presentes na região perianal de ovino procedente de biotério de criação, com suspeita de leptospirose



Foto: Washington Luis Assunção Pereira

Figura 3 – Cavidade abdominal. Gordura mesentérica de cor amarelada (ictérica) de ovino procedente de biotério de criação, com suspeita de leptospirose



Foto: Washington Luis Assunção Pereira

Figura 4 – Rins apresentando difusamente cor avermelhada (congestão), em ovino procedente de biotério de criação, com suspeita de leptospirose

DISCUSSÃO

Os ovinos podem ser portadores e eliminadores da bactéria na urina por um tempo prolongado. Essa eliminação pode constituir um problema zoonótico para todos que entrarem em contato com o animal^{16,17,18}. A leptospirose é um problema ocupacional, pois pesquisas de isolamentos que foram conduzidas em diversos países têm demonstrado a importância dos ovinos na epidemiologia da doença, principalmente em relação à saúde pública^{7,16}.

Existem pesquisadores que apontam possíveis resistências dos ovinos à doença^{5,19}, porém outros relatam surtos de leptospirose aguda com perdas significativas, especialmente em animais jovens, caracterizados por febre alta, hemoglobinúria, anemia hemolítica, icterícia, hematúria e, em alguns casos, morte^{12,18,20}.

Houve a identificação dos sorovares Copenhageni e Icterohaemorrhagiae, que são os principais agentes etiológicos dos casos de leptospirose em humanos no Brasil, confirmando o papel do rato doméstico como o principal reservatório, uma vez que o *Rattus rattus* e o *Rattus norvegicus* são os reservatórios mais comuns desses sorovares³, destacando desta maneira a importância dos programas de controle de roedores junto à área de criação. Alguns inquéritos sorológicos realizados no Brasil encontraram esses dois sorovares como um dos mais frequentes^{9,21,22,23,24,25,26}.

O predomínio da reatividade ao sorovar Castellonis concorda com citações de outros autores²⁷ e demonstra que também foi um dos mais frequentes em ovinos^{5,16,28,29}.

Há escassas informações na literatura sobre a prevalência do sorovar Cynopteri em ovinos. Este sorovar foi identificado infectando ovinos de fazendas em outros países, como Portugal, nas Ilhas Antilhas, Itália e Sudão^{5,30,31,32,33}. No Brasil, Carvalho²⁴, detectou o sorovar em um estudo realizado durante abate em feiras livres no Município de Teresina, Estado do Piauí. No Estado do Pará pouco se conhece sobre a soroprevalência da leptospirose em ovinos.

Diferentemente de outros autores^{1,18,34,35,36} que afirmam que a leptospira sorovar Hardjo é uma das mais prevalentes nos plantéis e ou rebanho de ovinos, não houve a identificação deste neste estudo, mostrando que o diagnóstico de sorovares infectantes para ovinos pode variar dependendo da região.

As respostas sorológicas que foram observadas, podem significar exposição natural à infecção, visto que a vacinação não é preconizada na criação de ovinos utilizados em pesquisa biomédica.

As diferenças e os resultados encontrados em outros trabalhos podem ser atribuídos a fatores metodológicos como ponto de corte, modalidade de teste e coleção de antígenos empregados, todavia não se pode excluir a hipótese do aumento da disseminação de um determinado sorovar na dependência de fatores ambientais ligados ao manejo e a movimentação de animais²¹.

Um grande número de artigos publicados demonstra a utilidade da PCR em tempo real relacionada à área microbiológica³⁷. A PCR em tempo real é uma metodologia atrativa na substituição da cultura convencional e dos ensaios baseados em antígenos, devido sua elevada sensibilidade e especificidade, associada a um curto tempo para a liberação dos resultados e facilidade de realização da técnica. Além disso, é uma técnica capaz de quantificar o gene alvo produzido a cada ciclo.

Mesmo com apenas uma amostra com detecção do Ct e não reagente no SAM, percebemos que há uma vantagem do qPCR em relação ao SAM, não havendo necessidade de soroconversão (título de 1:100 ou mais)

para que a leptospirose possa ser diagnosticada. Esta detec o precoce   extremamente importante para que medidas de controle sejam providenciadas.

São necessários o isolamento e identifica o dos sorovares circulantes nos rebanhos e/ou plantéis, objetivando não somente avaliar sua adapta o e intera o com as condi es de manejo e ambiente, mas também para definir quais sorovares   mais prevalente em determinada região, investigar a patogenicidade e decidir a incorpora o destes nas vacinas nacionais.

Com rela o aos achados de necropsia têm-se as altera es macroscópicas que incluem graus variáveis de icterícia, hemorragia e anemia, além da presença de sangue na urina. Em alguns animais, os rins podem estar aumentados e com hemorragias petequiais na sua superf cie¹⁰. Este fato ocorre devido   preferência que as leptospirosas têm pelos rins, nos quais provocam lesões severas. Nas lesões renais túbulo-intersticiais são consideradas as altera es patológicas básicas

da doen a³⁵, no entanto, no presente estudo, não foi possível realizar a análise histopatológica dos tecidos, devido ao avançado estado autolizado dos mesmos.

CONCLUSÃO

Constatou-se que na cria o 50% de animais eram reagentes   SAM, com a identifica o dos sorovares Icterohaemorrhagiae e Copenhageni, o que sugere a necessidade de estudos visando o isolamento do agente na região e a caracteriza o de sua patogenicidade, uma vez que no Brasil estes são os principais agentes etiológicos dos casos de leptospirose em humanos.

A cria o de animais de produ o utilizados em pesquisa biomédica deve obedecer às recomenda es de cria o de animais de laboratório, para evitar entrada de animais invasores transmissores de patógenos como leptospirosas. Sendo assim, optou-se pela eutanásia de todo o plantel.



Serological, molecular and pathological investigation for leptospirosis in ovinos (*Ovis aries*) coming from a vivarium creation

ABSTRACT

The current paper reports an outbreak of leptospirosis in sheep production created with the purpose of blood supply to laboratories for production of growth medium and complement fixation test. Serological, molecular and histopathological analyses were performed. Serologic analysis was performed on 12 samples using the microscopic agglutination test with cutoff point of 100 for the serovars: *Leptospira* Bataviae, *L. Javanica*, *L. Panama*, *L. Hebdomadis*, *L. Castellonis*, *L. Icterohaemorrhagiae*, *L. Pyrogenes*, *L. Cynopteri*, *L. Serjoe*, *L. Australis*, *L. Wolffii*, *L. Copenhageni*, *L. Autumnalis*, *L. Pomona* e *L. Tarassovi*. Anatomopathological examination was performed on only one animal, which was found dead and molecular analyzes were performed in its blood and urine using the qPCR technique. 50% of those animals were reagents to the serological diagnosis, being identified the serovars: *L. Copenhageni* (1/100 e 1/200), *L. Castellonis* (1/200 e 1/200), *L. Icterohaemorrhagiae* (1/200) e *L. Cynopteri* (1/200). The necropsied animal presented bleeding, jaundice and hemoglobinuria. Molecular analysis showed three positive animals in blood samples and two positive animals in urine samples, with no concomitant positivity for each animal. The identification of *Icterohaemorrhagiae* and *Copenhageni* serovars suggests the need for studies aiming the agent isolation in the Brazilian Amazon Region and characterization of its pathogenicity since in Brazil these are the main etiologic agents of leptospirosis cases in humans.

Keywords: *Leptospira*; Sheep; Vivarium.

Investigación serol gica, molecular y anatomopatológica para leptospirosis en ovinos (*Ovis aries*) procedentes de un bioterio de cría

RESUMEN

El presente trabajo relata un brote de leptospirosis que tuvo lugar en el plantel de ovinos criados con la finalidad de proveer sangre a los laboratorios para producir medios de cultivos y de pruebas de fijación de complemento. Se realizaron análisis serológico, molecular e histopatológico. El análisis serológico se hizo en 12 muestras utilizando la prueba de seroaglutinaci n microscópica con punto de corte 100, para los sorovares *Leptospira* Bataviae, *L. Javanica*, *L. Panama*, *L. Hebdomadis*, *L. Castellonis*, *L. Icterohaemorrhagiae*, *L. Pyrogenes*, *L. Cynopteri*, *L. Serjoe*, *L. Australis*, *L. Wolffii*, *L. Copenhageni*, *L. Autumnalis*, *L. Pomona* y *L. Tarassovi*. El examen anatomopatológico se realizó en solamente uno de los animales, el cual fue hallado muerto y los análisis moleculares se hicieron en sangre y orina utilizando la técnica de PCR. Fueron reactivos al diagnóstico serológico 50% de los animales, siendo identificados los sorovares *L. Copenhageni* (1/100 y 1/200), *L. Castellonis* (1/200 y 1/200), *L. Icterohaemorrhagiae* (1/200) y *L. Cynopteri* (1/200). En la necropsia el animal presentó hemorragia, ictericia y hemoglobinuria. El análisis molecular demostró tres animales positivos en muestras de sangre y dos animales positivos en muestras de orina, no surgió positividad concomitante para un mismo animal. La identificación de los sorovares *Icterohaemorrhagiae* y *Copenhageni* sugiere la necesidad de estudios, con el objetivo de aislar el agente en la región y la caracterización de su patogenicidad, teniendo en vista que en Brasil estos son los principales agentes etiológicos de los casos de leptospirosis en humanos.

Palabras clave: *Leptospira*; Ovinos; Bioterio.



REFERÊNCIAS

- 1 Oliveira SV, Arsky MLNS, Caldas EP. Reservatórios animais da leptospirose: uma revisão bibliográfica. *Rev Saude Santa Maria*. 2013 jan-jun;39(1):9-20.
- 2 Vasconcellos SA, Marvulo MFV, Paula CD, Ferreira PM, Morais ZM, Delbem ACB, et al. Detection of *Leptospira* in two free living populations of capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) from São Paulo State, Brazil. In: Proceedings 3rd Scientifica Meetings International Leptospirosis Society; 2002 Oct 28-30; Los Angeles: ILS; 2002; 62 p.
- 3 Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de vigilância epidemiológica [Internet]. 7. ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2009 [citado 2014 jul 10]. Caderno 8: leptospirose; p. 15. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_epidemiologica_7ed.pdf.
- 4 Ellis WA. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 1994 Nov;10(3):463-78.
- 5 Ciceroni L, Lombardo D, Pinto A, Ciarrocchi S, Simeoni J. Prevalence of antibodies to *Leptospira* serovars in sheep and goats in Alto Adige, South Tyrol. *J Vet Med*. 2000 Apr;47(3):217-23.
- 6 Santa Rosa CA, Castro AFP. Presença de aglutininas anti-leptospiras em soros de ovinos e caprinos no estado de São Paulo. *Arq Inst Biol Sao Paulo*. 1963;30:93-8.
- 7 Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira* and leptospirosis. 2nd. ed. Melbourne: Medisci; 1999. 272 p.
- 8 Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev*. 2001 Apr;14(2):296-326.
- 9 Higino SSS, Azevedo SS, Alves CJ, Figueiredo SM, Silva MLCR, Batista CSA. Frequência de leptospirose em ovinos abatidos no município de Patos, Paraíba. *Arq Ins Biol*. 2010 jul-set;77(3):525-7.
- 10 World Health Organization. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. Geneva: WHO; 2003. 122 p.
- 11 Bal AE, Gravekamp C, Hartskeerl RA, Meza BJ, Kurver H, Terpstra WJ. Detection of leptospirosis in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol*. 1994 Aug;32(8):1894-8.
- 12 Davidson JN, Hirsh DC. Leptospirosis in lambs. *J Am Vet Med Assoc*. 1980 Jan;176(2):124-5.
- 13 Leon-Vizcaino L, Hermoso MM, Garrido F. Incidence of abortions caused by leptospirosis in sheep and goats in Spain. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 1987;10(2):149-53.
- 14 Grooms DL, Bolin CA. Diagnosis of fetal loss caused by bovine viral diarrhoea virus and *Leptospira* spp. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 2005 Jul;21(2):463-72.
- 15 Stoddard RA, Gee JE, Wilkins PP, McCaustland K, Hoffmaster AR. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009 Jul;64(3):247-55.
- 16 Azevedo SS, Alves CJ, Andrade JSL, Batista CSA, Clementino IJ, Santos FA. Occurrence of anti-*Leptospira* agglutinins in sheep of the Rio Grande do Norte State, Brazil. *Rev Bras Cienc Vet*. 2004;11(3):167-70.
- 17 Melo LSS, Castro MBC, Leite RC, Moreira CM, Melo CB. Principais aspectos da infecção por *Leptospira* sp em ovinos. *Cienc Rural*. 2010 mai;40(5):1235-41.
- 18 Salaberry SRS, Castro V, Nassar AFC, Castro JR, Guimarães EC, Ribeiro AMCL, et al. Seroprevalence and risk factors of antibodies against *Leptospira* spp. in ovinos from Uberlândia municipality, Minas Gerais state, Brazil. *Braz J Microbiol*. 2011 Oct-Dec;42(4):1427-33.
- 19 Hathaway SC. Leptospirosis in New Zealand: an ecological view. *N Z Vet J*. 1981 Jul;29(7):109-12.
- 20 Vermut JJ, West DM, Cooke MM, Alley MR, Collins-Emerson J. Observations on three outbreaks of *Leptospira interrogans* serovar pomona infection in lambs. *N Z Vet J*. 1994 Aug;42(4):133-6.
- 21 Favero ACM, Pinheiro SR, Vasconcelos SA, Moraes ZM, Ferreira F, Ferreira Neto JS. Sorovares de leptospiras predominantes em exames sorológicos de bubalinos, ovinos, caprinos, equinos, suínos e cães de diversos estados brasileiros. *Cienc Rural*. 2002;32(4):613-9.
- 22 Araújo Neto JO, Alves CJ, Azevedo SS, Silva MLCR, Batista CSA. Soroprevalência da leptospirose em caprinos da microrregião do Seridó Oriental, Estado do Rio Grande do Norte, Brasil, e pesquisa de fatores de risco. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2010;47(2):150-5.
- 23 Escócio C, Genovez ME, Castro V, Piatti RM, Gabriel FHL, Chiebao DP, et al. Influência das condições ambientais na transmissão da leptospirose entre criação de ovinos e bovinos da região de Sorocaba, SP. *Arq Inst Biol*. 2010 jul-set;77(3):371-9.
- 24 Carvalho SM. Avaliação das alterações em rim, fígado e pulmões de ovinos infectados por leptospiras [tese] Teresina (PI): Universidade Federal do Piauí; 2012. 74 p.

- 25 Santos PJ, Lima-Ribeiro AMC, Oliveira PR, Santos MP, Ferreira Junior A, Medeiros AA, et al. Seroprevalence and risk factors for Leptospirosis in goats in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. *Trop Anim Health Prod.* 2012 Jan;44(1):101-6.
- 26 Silva RC, Costa VM, Shimabukuro FH, Richine-Pereira VB, Menozzi BD, Langoni H. Frequency of *Leptospira* spp. in sheep from Brazilian slaughterhouses and its association with epidemiological variables. *Pesq Vet Bras.* 2012 Mar;32(3):194-8.
- 27 Barbante P, Shimabukuro FH, Langoni H, Richini-Pereira VB, Lucchesei SB. *Leptospira* spp. infection in sheep herds in southeast Brazil. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2014 Jun;20:20.
- 28 Caldas EM, Viegas EA, Viegas SARA, Reis RS, Santos MS. Aglutininas antileptospira em hemo-soros de animais domésticos no Estado da Bahia. *Arq Esc Med Vet UFBA.* 1993;16(1):49-59.
- 29 Langoni H, Marinho M, Baldoni S, Silva AV, Cabral KG, Silva ED. Pesquisa de aglutininas antileptosp ricas em soros de ovinos no estado de São Paulo, Brasil, utilizando provas de macroaglutina o em placa e soroaglutina o microscópica. *Rev Bras Med Vet.* 1995;17:264-8.
- 30 Sebek Z, Sixl W, Reinthaler F, Abdel ON, Stunzer D, Schneeweiss W, et al. Leptospirosis in the Melut district- upper Nile province (south Sudan)-an overview. *Geogr Med Suppl.* 1989;5:161-78.
- 31 Sebek Z, Sixl W, Reinthaler F, Valov  M, Schneeweiss W, Stunzner D, et al. Results of serological examination for leptospirosis of domestic and wild animals in the Upper Nile province (Sudan). *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol.* 1989;33(3):337-45.
- 32 Levett PN, Whittington CU, Camus E. Serological survey of leptospirosis in livestock animals in the Lesser Antilles. *Ann N Y Acad Sci.* 1996 Jul;791:369-77.
- 33 Rocha T. A review of leptospirosis in farm animals in Portugal. *Rev Sci Tech.* 1998 Dec;17(3):699-712.
- 34 Ribeiro SCA, Bisnoto DP, Oliveira PR. Prevalência da leptospirose em fêmeas reprodutoras bovinas do município de Uberlândia, MG. *Vet Noticias.* 2000;6(1):69-75.
- 35 Hermann GP, Lage AP, Moreira EC, Haddad JPA, Resende JR, Rodrigues RO, et al. Soroprevalência de aglutininas anti-*Leptospira* spp. em ovinos nas Mesoregi es Sudeste e Sudoeste do Estado Rio Grande do Sul, Brasil. *Cienc Rural.* 2004 mar-abr;34(2):443-8.
- 36 Aguiar DM, Cavalcante GT, Vasconcellos SA, Souza GO, Labruna MB, Carmargo LMA, et al. Anticorpos anti-*Leptospira* spp. em ovinos do município de Monte Negro, Estado de Rondônia. *Arq Inst Biol.* 2010 jul-set;77(3):529-32.
- 37 Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev.* 2006 Jan;19(1):165-256.

Recebido em / Received / Recibido en: 27/11/2014
Aceito em / Accepted / Aceito en: 3/12/2015