

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS

DIANA DE OLIVEIRA SILVA AZEVÊDO

**AVALIAÇÃO SORO-EPIDEMIOLÓGICA DA LEPTOSPIROSE CANINA
DE AMOSTRAS COLETADAS EM BAIRROS RESIDENCIAIS DE
CRUZ DAS ALMAS-BA, BRASIL**

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA

JULHO – 2016

DIANA DE OLIVEIRA SILVA AZEVÊDO

**AVALIAÇÃO SORO-EPIDEMIOLÓGICA DA LEPTOSPIROSE CANINA
DE AMOSTRAS COLETADAS EM BAIROS RESIDENCIAIS DE
CRUZ DAS ALMAS-BA, BRASIL**

Trabalho de conclusão submetido ao Colegiado de Graduação de Medicina Veterinária do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Médico Veterinário.

Orientador: Prof. Dr. Robson Bahia Cerqueira

Co-orientador: Prof. MSc. Marcus Paulo de Matos Maturino

CRUZ DAS ALMAS – BA

JULHO – 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
COLEGIADO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CCA106 – TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

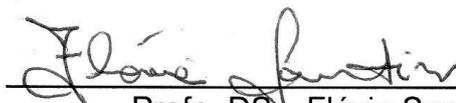
COMISSÃO EXAMINADORA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

DIANA DE OLIVEIRA SILVA AZEVEDO

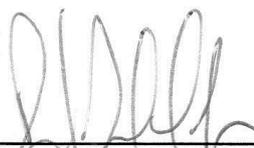
AVALIAÇÃO SORO-EPIDEMIOLÓGICA DA LEPTOSPIROSE CANINA DE AMOSTRAS
COLETADAS EM BAIRROS RESIDENCIAIS DE CRUZ DAS ALMAS-BA, BRASIL



Prof. MSc. Marcus Paulo de Matos Maturino
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia



Profa. DSc. Flávia Santin
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia



Prof. DSc. Ricardo Mendes da Silva

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DEDICATÓRIA

A meus pais, Elza de O. S. Azevedo e Roque da S. Azevedo, a meu irmão Diego, as minhas tias, Leda, Leticia, Rita, Suelma e Zete, a meu noivo Lucas, por todo apoio e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu principal motivador, por estar ao meu lado em todos os momentos, me concedendo sabedoria e forças para realizar este sonho.

A toda minha família, pelo apoio, carinho e torcida, em especial a meus pais Roque e Elza, por terem me ensinado a lutar diante das adversidades da vida, a eles devo meu caráter, minha ética como pessoa e profissional.

A meus amigos, Bianca, Caline, Delcivan, Flávia, Gabriel, Jaiala, Keila, Lourival, Luana, Pedro, Sâнора e William, pelas risadas, resenhas e ajuda nos estudos.

A meu amor Lucas, com sua compreensão e disposição a me ajudar.

A meus orientadores, Alexandre Morais Pinheiro e Robson Bahia Cerqueira, pessoas de grande conhecimento, que me acolheram durante esses anos, abrindo portas.

A todos os outros professores, profissionais e colegas. Por mais que não saibam desta pequena lembrança, foram grandes alicerces da construção de minha formação profissional.

Ao grupo de pesquisa Gpisy, por todo conhecimento compartilhado e por se mostrarem pessoas fundamentais nessa pesquisa.

Aos funcionários, Ana Paula e Roque Antônio Menezes, por grande auxílio durante a pesquisa.

Aos membros da banca examinadora deste Trabalho de Conclusão de Curso.

Muito obrigada!!!

EPÍGRAFE

*“Porquanto é o SENHOR quem concede sabedoria,
e da sua boca procedem à inteligência e o
discernimento”. Provérbios 2:6*

RESUMO

A leptospirose é uma enfermidade infectocontagiosa, cosmopolita, ocasionada por espiroquetas antigenicamente distintas da bactéria *Leptospira interrogans*. Roedores, pequenos carnívoros e animais domésticos são reservatórios conhecidos dessa enfermidade. Os cães representam um importante elo na transmissão da leptospirose, visto que, aparentemente sadios, podem albergar leptospiras e eliminá-las no meio ambiente, propício à disseminação para outras espécies, inclusive aos seres humanos. Com o objetivo de se conhecer a prevalência sorológica anti-leptospírica em cães de Cruz das Almas - BA e os fatores de risco para essa zoonose, foram coletadas amostras de sangue de 200 cães. A prova diagnóstica utilizada foi a Soroaglutinação Microscópica (SAM), testando-se 19 sorovares, considerando-se reagente a partir do título ≥ 100 . Das 200 amostras testadas, 60 (30%) foram reagentes, sendo o sorovar *javanica* (6/60) de maior prevalência. Outros sorovares encontrados foram: *castellonis*, *hardjo*, *sejroe*, *tarassovi* (3/60); *icterohaemorrhagiae*, *canicola*, *grippotyphosa*, *cynopteri*, *panama*, *pyrogenes*, *patoc*, *hebdomadis* (2/60) e *copenhageni*, *pomona*, *bataviae*, *autumnalis*, *wolffi* (1/60). Em relação a análise do questionário epidemiológico, apenas a variável idade (OR= 2,5; p= 0,022) foi significativamente associada a presença de anticorpos anti - *Leptospira*. Ao incorporar cada uma das variáveis em estudo com a idade, encontrou-se significância estatística para presença de roedores (OR= 2,19; p= 0,020), acesso a rua (OR= 1,88; p= 0,029) e o não uso de raticida (OR= 1,63; p= 0,044). Os resultados demonstram que a sororeatividade dos cães representam risco de disseminação da leptospirose para outros animais e para o ser humano.

Palavra-chaves: leptospirose, cão, soroaglutinação microscópica, análise de risco.

ABSTRACT

Leptospirosis is an infectious disease, cosmopolitan, caused by spirochete antigenically distinct from the *Leptospira interrogans* bacterium. Rodents, small carnivores and domestic animals are known reservoirs of the disease. Dogs are an important bond in the leptospirosis transmission, as apparently healthy, may housing leptospire and eliminating them in the environment, providing the spread to others species, including humans. With aim of knowing the serologic anti-leptospira prevalence in Cruz das Almas (BA)´ dogs and risk factors for this zoonosis, blood samples were collected from 200 dogs. The diagnostic test used was Microscopic agglutination test (MAT), by testing 19 serovars, considering reagent as from the titration superior or equal than 100. From the 200 samples tested, 60 (30%) were positive, and the javanica serovar (6/60) the most prevalent. Others sovars found were: *castellonis*, *hardjo*, *sejroe*, *tarassovi* (3/60); *icterohaemorrhagiae*, *canicola*, *grippotyphosa*, *cynopteri*, *panama*, *pyrogenes*, *patoc*, *hebdomadis* (2/60) and *copenhageni*, *pomona*, *bataviae*, *autumnalis*, *wolffi* (1/60). About the analysis of the epidemiological questionnaire, only the age (OR= 2,5; p= 0,022) variable was significantly associated with the presence of *Leptospira* antibodies. By incorporating each of the study variables with age, there was statistical significance for rodents presence (OR = 2.19; p = 0.020), street access (OR = 1.88; p = 0.029) and not rodenticide using (OR = 1.63, p = 0.044). The results shows that the seroreactivity by the dogs representes leptospirosis dissemination risk for other animals and humans.

Keyword: leptospirosis, dog, microscopic agglutination, risk analysis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Micrografia eletrônica de <i>Leptospira biflexa</i>	17
Figura 2 - Leptospiras vistas em microscopia de campo escuro - aumento de 100x18	
Figura 3 - Demonstração das proteínas e lipoproteínas de membrana da leptospira.....	21
Figura 4 - Cães com leptospirose apresentando icterícia em diferentes locais anatômicos: A) Icterícia cutânea. B) Icterícia em mucosa oral. C) Esclera icterica. D) Subcutâneo icterico no tecido adiposo.....	34
Figura 5 - Fígados de cães com leptospirose: A) fígado icterico com bordos arredondados. B) fígado icterico com padrão lobular e friável ao toque.....	35
Figura 6 - Localização geográfica do município de Cruz das Almas, Bahia, Brasil.....	41
Figura 7 – Contenção e coleta de sangue por punção da veio cefálica dos cães domiciliados da cidade de Cruz das Almas, Bahia, Brasil.....	43
Figura 8 - Aplicação de questionário aos proprietários da cidade de Cruz das Almas, Bahia, Brasil.....	44
Figura 9 – Diluição das amostras de soro canino (A) e diluição das cepas de leptospira (B).....	46
Figura 10 - Distribuição das amostras de soro canino na lâmina previamente preparada.....	47
Figura 11 – Exemplificação das titulações realizadas com as amostras de soro sanguíneo separadas na triagem.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Demonstração dos sorogrupos e variantes sorológicas das leptospiros..	45
Tabela 2 - Frequência da positividade de amostras sorológicas de cães da cidade de Cruz das Almas, Bahia, Brasil, ao teste de SAM, segundo o sorovar reagente e o título obtido.....	49
Tabela 3 – Distribuição dos maiores títulos de anticorpos contra <i>Leptospira</i> spp. com coaglutinações, em cães da cidade de Cruz das Almas, Bahia, Brasil.	50
Tabela 4 – Resultados da associação das variáveis epidemiológicas e a detecção de anticorpos anti-leptospira, com respectivos valores de <i>odds ration</i> , intervalo de confiança (IC) e a significância ($\alpha \leq 0,05$), realizado na cidade de Cruz das Almas, Bahia, Brasil.	51
Tabela 5 – Análise das variáveis estudadas com a variável idade e respectivos valores de <i>odds ratio</i> , intervalo de confiança (IC) e significância ($\alpha \leq 0,05$).....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BA: Bahia

BSA: Albumina sérica bovina

BID: Duas vezes ao dia

CAAT: Teste de absorção e aglutinação cruzada

CID: Coagulação intravascular disseminada

DNA: Ácido desoxirribonucleico

ELISA: Ensaio de adsorção imuno-enzimático

EMJH: Meio Ellinghausen McCullough Johnson Harris

IC: Intervalo de confiança

IgM: Imunoglobulina M

IgG: Imunoglobulina G

IV: Intravenoso

Kg: Quilogramas

LCR: Líquido cefalorraquidiano

Len: Leptospiral endostatin-like

Lig: Leptospiral Immunoglobulin-like

LPS: Lipopolissacarídeo

Omp: Proteína de membrana externa

OMS: Organização mundial de saúde

OR: *Odds ratio*

MAT: Teste de aglutinação microscópica

mg: Miligramas

ml: Mililitros

NaCl: Cloreto de sódio

pH: Potencial hidroniônico

PCR: Polymerase Chain Reaction (reação em cadeia de polimerase)

Rpm: Rotação por minuto

SAM: Soroaglutinação microscópica

TID: Três vezes ao dia

VO: Via oral

µm: Micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 AGENTE ETIOLÓGICO	17
2.2 CARACTERÍSTICAS DE CULTIVO E CRESCIMENTO	19
2.3 ASPECTOS ANTIGÊNICOS	20
2.4 TRANSMISSÃO	22
2.5 EPIDEMIOLOGIA.....	23
2.6 RESPOSTA IMUNE	25
2.7 PATOGENIA	26
2.8 SINAIS CLÍNICOS	28
2.9 DIAGNÓSTICO	29
2.9.1 DIAGNÓSTICO CLÍNICO	29
2.9.2 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	29
2.9.2.1 Hemograma e perfil bioquímico	29
2.9.2.2 Urinálise.....	30
2.9.2.3 Microscopia de campo escuro	30
2.9.2.4 Soroaglutinação microscópica (SAM).....	31
2.9.2.5 Elisa.....	33
2.9.2.6 PCR (reação em cadeia pela polimerase)	33
2.9.2.7 Diagnóstico anatomo - patológico	34
2.9.2.8 Cultivo e isolamento do agente	36
2.9.3 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL	36
2.10 TRATAMENTO	36
2.11 PREVENÇÃO E CONTROLE	38
3 OBJETIVOS	40
3.1 GERAIS	40
3.2 ESPECÍFICOS	40
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
4.1 LOCAL DE ESTUDO	41
4.2 COLETA DAS AMOSTRAS	42
4.3 QUESTIONÁRIO.....	43

4.4 SOROLOGIA.....	44
4.4.1 Triagem.....	45
4.4.2 Titulação	47
4.5 ESTUDO ESTATÍSTICO.....	48
5 RESULTADOS	49
6 DISCUSSÃO	53
7 CONCLUSÃO.....	58
REFEÊNCIAS	59
ANEXO 1.....	72
ANEXO 2.....	73
ANEXO 3.....	74

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose com distribuição mundial, tendo sido descrita em todos os tipos de vertebrados de sangue quente, especialmente cães. O principal reservatório da *Leptospira* spp. no meio urbano é reconhecidamente o rato, particularmente o *Rattus norvegicus*, que a abriga de forma permanente, principalmente os membros do sorogrupo *Icterohaemorrhagiae*, sendo capaz de eliminá-los de forma intermitente e por longos períodos pela urina (FERNANDES, et. al, 2013).

No entanto, entre os animais domésticos, os cães assumem o papel de importante fonte de infecção, pela proximidade com os seres humanos e pela capacidade destes em eliminar leptospiras vivas através da urina, mesmo sem apresentar nenhum sinal clínico (NEGRÃO; GONÇALVES, 2012).

A prevalência desta enfermidade em cães é influenciada por vários fatores, dentre eles, os índices pluviométricos e a presença de roedores, justificando a alta taxa de ocorrência nas regiões tropicais e subtropicais (WASINSKI; DUTKIEWICZ, 2013), visto que essas condições ambientais elevam a sobrevivência da bactéria, o que aumenta o risco de exposição e infecção de animais susceptíveis e seres humanos (OLIVEIRA et al., 2010).

A transmissão depende das condições favoráveis à sobrevivência da leptospira no meio, do número de animais portadores e da disponibilidade de animais susceptíveis na população, do tempo que esses animais positivos permanecem como reservatórios e do grau de contato entre os hospedeiros de manutenção e hospedeiros acidentais (LEVETT, 2004).

O diagnóstico da leptospirose é realizado pela reação soroaglutinação microscópica, embora seja uma forma indireta, é o método de referência para a detecção da infecção em homens e animais (LEMOS et al., 2010; TEIXEIRA, M.A. et al., 2008). Ele é capaz de detectar IgM e IgG e permite a identificação do sorogrupo infectante, mas não discrimina se os anticorpos produzidos são decorrentes de uma infecção ou de uma vacinação (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

Além dos resultados sorológicos, é importante a avaliação dos fatores de risco aos quais os cães estão expostos, que justificam a sua importância como

reservatórios e fontes de infecção para o homem, permitindo, assim, um direcionamento racional das medidas de prevenção (AZEVEDO et al., 2011).

Seu tratamento consiste na administração de antimicrobianos que eliminem a fase leptospirêmica, e subsequentemente, a fase leptospirúrica. O controle e a prevenção baseiam-se em ações de educação em saúde da população, melhorias nas suas condições sanitárias e monitoramento dos reservatórios envolvidos no ciclo da doença. E também na utilização de vacinas multivalentes, que contém mais sorotipos de *Leptospiras*, propiciando um amplo espectro de proteção aos animais (SOEK, 2012).

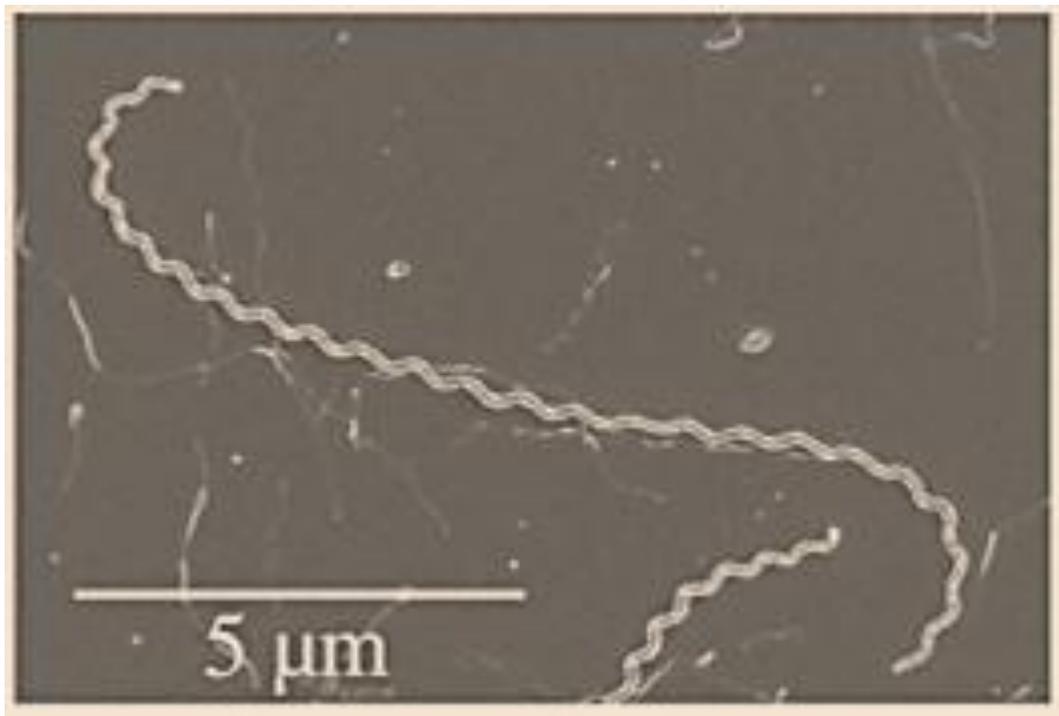
Tendo em vista a gravidade da leptospirose e a sua importância como zoonose, este trabalho teve como objetivo verificar a soroprevalência da leptospirose em cães provenientes de quatro bairros do município de Cruz das Almas – BA, bem como avaliar os fatores de risco relacionados aos animais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AGENTE ETIOLÓGICO

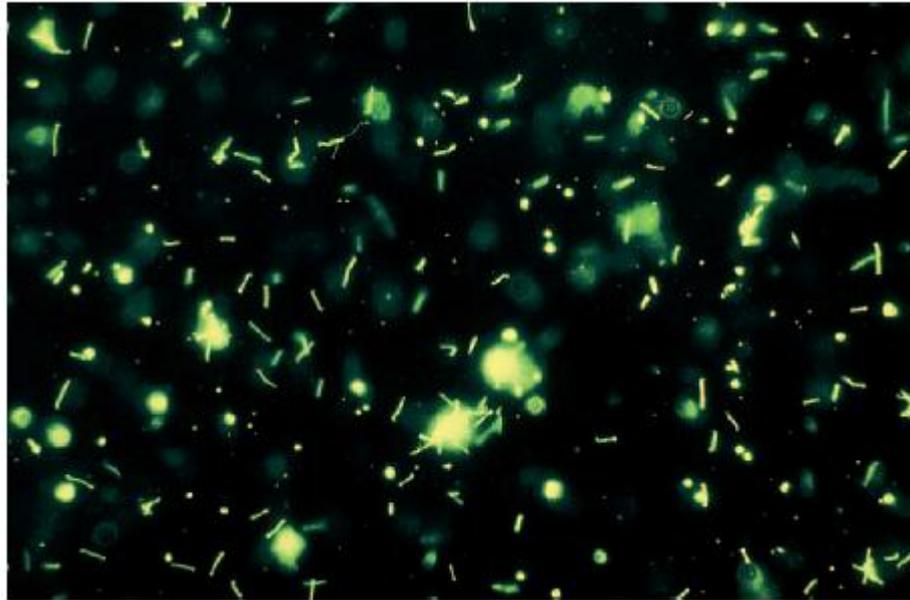
A leptospirose é ocasionada pela bactéria do gênero *Leptospira*, família *Leptospiraceae*, ordem *Spirochaeles* (GOMES, 2013). São organismos gram negativos, em formato de S ou C (LEFBVRE, 2003). Greene *et al.* (2006) relatam que possuem as seguintes características: são espiroquetas, espiraladas, flexíveis e móveis, constituídas por um cilindro protoplasmático que se enrola em volta de um filamento axial central, seu envelope externo é composto por lipopolissacarídeos (LPS) e mucopeptídeos antigênicos, são micro-organismos aeróbios obrigatórios, medindo usualmente de 6 a 20 μm de comprimento e de 0,1 a 0,2 μm de diâmetro e apresentando as extremidades dobradas ou em forma de gancho (Figura 1). Por causa de seu diâmetro pequeno, as leptospiros são melhor visualizadas por microscopia de campo escuro, aparecendo como ativas espiroquetas com motilidade (Figura 2) (LEVETT; HAAKE, 2009).

Figura 1 - Micrografia eletrônica de *Leptospira biflexa*



Fonte: STEWART *et al.*, 2012

Figura 2 - Leptospiras vistas em microscopia de campo escuro - aumento de 1000x



Fonte: LEVETT; HAAKE, 2009

A motilidade desta bactéria está à responsabilidade dos filamentos axiais: associados à parte interna da membrana, contraem periodicamente, gerando rotação da espiral e, portanto, movimento (QUINN, et al., 2005).

São organismos extracelulares, vulneráveis ao dessecação, isto é, não sobrevivem em locais sem água. Quando disseminadas na água, na lama ou na terra úmida, podem sobreviver por até três meses. Além de não sobreviverem à falta de água, também são muito sensíveis aos desinfetantes (MARCELINO; LAFETÁ, 2011), como por exemplo, hipoclorito de sódio, álcool, compostos de iodo e glutaraldeídos (FOSSUM, 2014).

O gênero *Leptospira* foi dividido anteriormente em duas espécies: *Leptospira interrogans* que compreende todas as estirpes patogênicas, e *Leptospira biflexa*, compreendendo leptospiras saprófitas isoladas do ambiente (RODRIGUES, 2008).

Ambas as espécies foram divididas em distintos sorovares fundamentado nas diferenças estruturais dos carboidratos que compõem a cadeia lateral do LPS através da prova de absorção de aglutinação cruzada (CAAT – Cross agglutination absorption test). (CERQUEIRA; PICARDEAU, 2009).

A partir desta classificação, foram identificados acima de 260 sorovares entre a *L. interrogans* e mais de 60 sorovares entre a *L. biflexa*. Cada um destes

sorovares tem uma cepa referência, a exemplo da cepa RGA que é a cepa referência para o sorovar *icterohaemorrhagiae* (VIJAYACHARI *et al.*, 2008).

Outra classificação é a genotípica, relaciona-se na hibridização do DNA-DNA, a partir desta foram determinadas vinte espécies entre leptospiros patogênicos e não-patogênicos. A classificação baseada no genoma permitiu demonstrar a variabilidade genética deste gênero. Entretanto, a divisão embasada na antigenicidade ainda é utilizada em virtude da sua relevância clínica e epidemiológica (BHARTI *et al.*, 2003).

2.2 CARACTERÍSTICAS DE CULTIVO E CRESCIMENTO

As leptospiros são organismos obrigatoriamente aeróbias e crescem numa temperatura de 28° a 30°C e pH 7,2 a 7,6 (LOMAR *et al.*, 2002; QUINN *et al.*, 2005). Em condições de cultivo em laboratório, não utilizam açúcares ou aminoácidos como combustível energético, apesar de possuírem em seu genoma os genes codificantes para todas as enzimas componentes da via glicolítica (NASCIMENTO *et al.* 2004).

O carbono e energia utilizada são ácidos graxos de cadeia longa com mais de 15 carbonos, dos quais grande parte da energia, se não inteiramente, é obtida da β - oxidação (FAINE, *et al.*, 1999).

As leptospiros são cultivadas *in vitro* em meios de cultura artificiais, porém a disponibilidade de CO₂ e ácidos graxos de cadeia longa são essenciais. O meio de cultivo mais usado é o Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH), que possui tweens – ácidos graxos complexados a sorbitol – como fonte de carbono, e albumina sérica bovina (BSA) como agente detoxificante (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

O crescimento das leptospiros é muitas vezes retardado no isolamento primário e as culturas têm de ser mantidas por cerca de treze semanas antes de serem descartadas. O crescimento no cultivo semissólido (com 0,1 a 0,2% de ágar) atinge uma concentração numa zona abaixo da superfície do meio, que se torna crescentemente turva com a incubação. Esse crescimento está relacionado com a tensão ótima de oxigênio, conhecida como anel ou disco de Dinger. São catalase positivas e oxidases negativas (GOMES, 2013).

São mantidas em meio semi-sólido com repiques periódicos para novo meio de cultura, de três em três meses. Sua delicadeza impede a visualização ao microscópio óptico comum, exigindo o emprego de microscopia de campo escuro ou de contraste de fase, o que inviabiliza o diagnóstico pelo Gram, podendo ser evidenciadas por técnicas de impregnação pela prata (método Fontana), ou pelo emprego de ensaio imuno-histoquímico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

As bactérias apresentam período de formação longo, variando de três horas para espécies saprófitas e oito a dezoito horas para espécies patogênicas, e o crescimento em meio de cultivo pode ser de dois a trinta dias (FAINE et al., 1999).

2.3 ASPECTOS ANTIGÊNICOS

As leptospiros são bactérias gram-negativas, mas com a camada de peptidoglicano unido a membrana citoplasmática interna e justaposto pela membrana externa (GOMES, 2013). Distribuídos na membrana externa possuem o LPS similar aos de outras bactérias gram negativas (ADLER e MOCTEZUMA, 2010), porém com atividade endotóxica menor (GOMES, 2013).

Os LPSs são compostos por três segmentos ligados covalentemente: lipídeo A, *core* e antígeno O. A porção do lipídeo A é conservado e ancora o LPS a membrana externa celular. O *core* é uma porção polissacarídica que forma uma região intermediária e mais externamente localiza-se o antígeno O, que consiste em grupos polissacarídicos altamente variáveis, sendo considerado o principal agente antigênico dos LPSs das bactérias gram-negativas (FAINE et al., 1999).

Existem cerca de doze proteínas presentes na superfície das leptospiros que tiveram sua localização comprovada, dentre essas, destacam-se: as Ligs, Loa22, LipL32, OmpL1, LenA, LenD (KO et al., 2009) e mais recentemente OmpL36, OmpL37, OmpL47 e OmpL54 (Figura3) (LO et al., 2009).

A LipL32 é uma proteína muito abundante em leptospiros patogênicos, não existindo em saprófitas, são expressas tanto durante a infecção quanto durante o cultivo em laboratório (MALMSTRON et al., 2009), o seu terminal C foi encontrado ligado a laminina, colágeno II-IV-V e fibrinogênio plasmático (HOKE et al., 2008) .

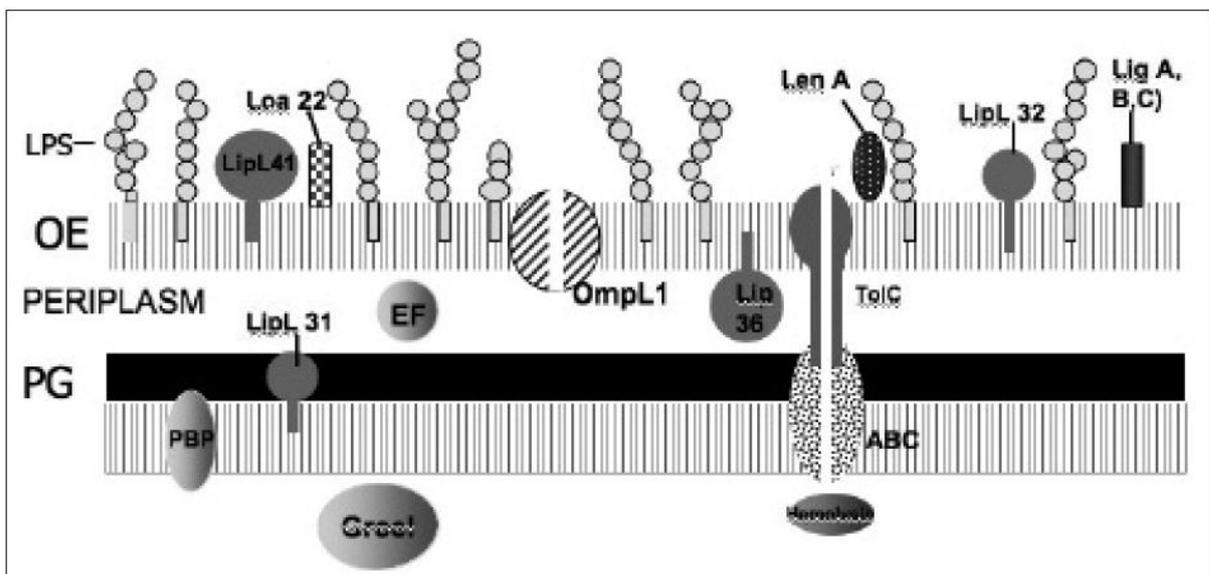
A OmpL1 é uma proteína transmembrana com função de porina (CULLEN, 2003), além disso, funciona como receptor para o fibrinogênio, essa interação favorece o quadro hemorrágico da leptospirose severa (OLIVEIRA et al., 2013).

A proteína LenA une-se ao fator H e ao fator H related protein (FHR-1) (VERMA et al., 2006). O fator H é uma proteína regulatória do sistema complemento. Para fugir da atuação do sistema complemento patógenos sequestram proteínas reguladoras desse sistema ou diminuem a atividade do mesmo (BLOM, 2002).

Com relação às Ligs, foram descritas duas proteínas, LigA e LigB, expressas em todas as espécies patogênicas de leptospira e LigC, presente em algumas espécies (MATSUNAGA et al., 2003). As proteínas LigA e LigB estão expostas na superfície bacteriana e a manifestação delas está correlacionada com a virulência das cepas de leptospira. A proteína LigB possui afinidade com componentes da matriz como fibronectina, fibrinogênio, laminina e elastina, que estão expostas na pele lesionada (CHOY et al.; 2007). Choy et al. 2011 demonstraram que segmentos recombinantes de LigB são capazes de inibir parcialmente a formação do tampão de coagulação, por meio da ligação ao fibrinogênio e fibrina.

Recentemente foi relatada a comunicação das proteínas LigA, LigB (LIN et al., 2011) e OmpL37 (PINNE; CHOY; HAAKE, 2010) com o fibrinogênio. Esse tipo de interação poderia ajudar esses microrganismos a sobreviverem e se disseminarem no hospedeiro (RIVERA et al., 2007).

Figura 3 – Demonstração das proteínas e lipoproteínas de membrana da leptospira



Fonte: Cinco, 2010

2.4 TRANSMISSÃO

A transmissão da leptospirose depende das condições favoráveis à sobrevivência da leptospira no meio, da quantidade de animais portadores e da disponibilidade de animais susceptíveis na população, do tempo que esses animais positivos permanecem como reservatórios e do nível de contato entre os hospedeiros de manutenção e hospedeiros acidentais (LEVETT, 2004).

Os hospedeiros de manutenção são aqueles que apresentam uma redução da resposta sorológica, sutis sinais clínicos e demorado estado de portador renal que pode ser associado, com doença renal crônica. Os hospedeiros acidentais são aqueles que possuem elevados títulos de anticorpos aglutinantes decorrente de uma grave doença e um reduzido estado de portador renal (GOMES, 2013).

Ocorre de forma direta através da manipulação com sangue ou urina de animais doentes, transmissão venérea, placentária ou por meio da pele (íntegra ou lesionada) (JORGENS, 2011), e de forma indireta por meio da exposição de animais suscetíveis a um ambiente contaminado, por exemplo, água morna de movimentação lenta ou estagnada (GREENE, 2004).

Burr, Lunn & Yam (2009) descrevem que as principais fontes de infecção são: água ou solo contaminado com urina infectada, a própria urina infectada, tecidos de animais infectados, sendo que a transmissão pode ocorrer por ingestão (água, alimentos, solo contaminados e tecidos infectados), contato com mucosas, contato com soluções de continuidade da pele (feridas e abrasões), mordeduras e fômites.

A água é considerada o meio de propagação mais prevalente, principalmente em habitats onde a água é morna e estagnada e o pH do solo é alcalino, condições que favorecem cada vez mais a sobrevivência da *Leptospira* (GREENE, 2008). Silva et al. (2006) demonstraram a relevância da água na difusão e manutenção das leptospiros na natureza, o que permite a propagação da enfermidade, que acontece por meio de água contaminada de rios, lagoas ou oriundas de chuvas. Assim, o contágio humano e canino acontece principalmente em situações de enchentes e inundações, onde a urina dos roedores está presente em esgotos e bueiros que se misturam as enxurradas e à lama de enchentes (BLAZIUS et al., 2005).

Os roedores sinantrópicos são os principais reservatórios da enfermidade, não desenvolvem a doença ao se infectarem, transformando-se em portadores, alojando as leptospira nos rins, expelindo-a viva no meio ambiente e contaminando, dessa forma, água, solo e alimentos. O *Rattus norvegicus* (ratazana ou rato de esgoto) é o principal portador do sorovar *icterohaemorrhagiae*, um dos mais patogênicos para o ser humano. Outros reservatórios de importância são: caninos, suínos, bovinos, equinos, ovinos e caprinos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Os cães são reservatórios do sorovar canicola, mas também podem servir como hospedeiros secundários de outros sorovares patogênicos (STOKES; DRU FORRESTER, 2004), eles podem adquirir a doença através de contato com outros cães, com restos de alimentos contaminados, por ratos que podem urinar nos comedouros ou pelo contato direto com roedores contaminados. Os animais de vida livre adquirem o hábito de se alimentar de restos de comida e beber água poluída ficando expostos a agentes infecciosos, por isso os cães podem ser considerados uma das principais fontes de infecção da leptospirose humana, disseminando a bactéria pela urina durante meses sem apresentar sinais clínicos (LEMOS 2010).

De acordo com Gaschen (2008), os cães de grande porte, machos, de meia-idade e criados em ambientes externos, em áreas periurbanas, são os mais acometidos. Todos podem se infectar, porém os animais que trabalham como cães de caça ou pastoreio estão em maior risco de desenvolvimento de leptospirose em comparação aos cães que ficam dentro de casa.

2.5 EPIDEMIOLOGIA

A leptospirose é de ocorrência variável nas diferentes regiões do mundo, podendo apresentar-se tanto na forma esporádica quanto na endêmica, já a dependência dos sorovares de *Leptospira* spp varia conforme a região geográfica (MELLO; MANHOSO, 2007).

Burr, Lunn & Yam (2009) preconizam que a distribuição dos diferentes sorovares de *L. interrogans* pode estar associada com a disponibilidade do hospedeiro de manutenção, por esta razão é plausível que os sorovares predominantes identificados nos hospedeiros acidentais variem consoante posição geográfica.

Os caninos realizam importante função no ciclo da doença, pois atuam como sentinelas, podendo advertir quanto à inserção de um novo sorovar de caráter zoonótico, e também se comportar como indicadores de contaminação ambiental (BLAZIUS et al., 2005).

A prevalência desta enfermidade em cães é influenciada por vários fatores, dentre eles, os índices pluviométricos e a presença de roedores, justificando a alta taxa de ocorrência nas regiões tropicais e subtropicais (WASINSKI; DUTKIEWICZ, 2013), visto que essas condições ambientais elevam a sobrevivência da bactéria, o que aumenta o risco de exposição e infecção de animais susceptíveis e seres humanos (OLIVEIRA et al., 2010).

Os roedores desempenham o comportamento de principal reservatório da enfermidade, pois albergam as leptospiros nos rins, eliminando-as vivas no meio ambiente e, contaminando água, solo e alimentos (ANDRADE, 2010). Segundo Greene et al. (2006), para cães urbanos, a grande fonte de infecção é o contato direto com ratos ou indireto com sua urina contaminada.

Dentre as causas que contribuem para constância dos focos de leptospirose, deve-se destacar o alto grau de variação antigênica, à habilidade de sobrevivência no meio ambiente (até 180 dias) e à vasta diversidade de animais sujeitos que podem hospedar o microrganismo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Guidi (2006) verificou que a persistência da bactéria no ambiente depende de condições favoráveis como clima temperado e úmido, solos saturados de água e pH neutro, tornando viável a sobrevivência de leptospiros por até 180 dias, no entanto, só resistem 30 minutos quando o solo está seco ao ar.

Em trabalho realizado por Benitez et al. (2010) observaram que as leptospiros são bactérias sensíveis a luz solar direta, aos desinfetantes comuns e aos antissépticos, com período de sobrevivência na água variando de acordo com a temperatura, pH, salinidade e grau de poluição.

Vários inquéritos sorológicos no Brasil mostram a variabilidade na distribuição de sorovares de *Leptospira spp.* em diferentes regiões (TESSEROLI et al., 2008). Em estudo realizado por Coiro et al. (2011) avaliaram a frequência de anticorpos para vários agentes zoonóticos em 302 amostras de soro de cães provenientes de Botucatu-SP, dentre eles a leptospira, com 23 soros reagentes. Destes, 15 foram reagentes para o sorovar *canicola*, 4 para o sorovar *pyrogenes*, 2 para o sorovar *hardjo* e dois para o sorovar *djasiman*.

Trabalho realizado por Kikuti et al. (2012), em um estudo retrospectivo com 1195 soros de cães testados para o diagnóstico de leptospirose junto ao Serviço de Diagnóstico de Zoonoses/ Unesp/ Botucatu, demonstrou que a soroprevalência de cães infectados foi de 20,8%, tendo-se como sorovares prevalentes *canicola* (6,7%), *copenhageni* (5,0%), *icterohaemorrhagiae* (2,9%), *autumnalis* (2,9%), *pyrogenes* (2,8%), *pomona* (2,0%), *hardjo* (2,0%), *australis* (1,8%), *bratislava* (1,6%), *cynopteri* (1,4%), *grippotyphosa* (1,3%) e *djasiman* (1,0%).

Estudos sorológicos realizados na cidade de Curitiba, por dois anos consecutivos, revelaram a presença de leptospirosas em 14,4% e 38,9% dos cachorros analisados em 2009 e 2010, respectivamente, sendo os sorovares *canicola* e *icterohaemorrhagiae* os mais prevalentes (MARTINS et al., 2013).

Filho (2012) em inquérito sorológico da leptospirose na região metropolitana de Recife, dos 187 soros de cães analisados, sete foram sororeagentes, onde os sorovares mais prevalentes foram o *icterohaemorrhagiae* (4/7), *copenhageni* (2/7), *castellonis* (1/7) e *pomona* (1/7). Oliveira (2010) avaliou 253 provenientes de Porto Alegre, onde foram encontrados 48,2% (122/253) de soropositividade para um ou mais sorovares, sendo os mais prevalentes *canicola*, *icterohaemorrhagiae* e *copenhageni*.

2.6 RESPOSTA IMUNE

As leptospirosas, ao alcançar a corrente sanguínea precisam superar o sistema imunológico do hospedeiro para conseguirem se disseminar e atingir outros tecidos. Os primeiros componentes com que se deparam são os do sistema inato (MERI et al., 2005), este representa um dos mecanismos mais importantes de defesa durante as primeiras horas de infecção através da ativação da via alternativa do sistema complemento. A imunidade adquirida depende, maioritariamente, da produção de anticorpos e da ativação da via clássica do sistema complemento (FRAGA, BARBOSA, & ISAAC, 2011).

O sistema complemento é um importante mecanismo da imunidade inata, que tem a capacidade de reconhecer rapidamente e destruir patógenos por opsonização de bactérias e produção de anafilatoxinas que recrutam neutrófilos e ativam macrófagos. Formado por uma complexa cascata de proteínas altamente regulada,

o sistema complemento é organizado de tal forma que três vias distintas de inicialização (alternativa, clássica e lectina) convergem para a formação de um complexo terminal citolítico. As leptospiras se ligam aos reguladores solúveis fator H e C4BP interferindo tanto na via alternativa como na via clássica do complemento. Esses reguladores ligados a bactéria mantém sua atividade de cofator para a enzima fator I, responsável pela clivagem de C3b e C4b. Dessa maneira as leptospiras impedem a formação de C3 convertase evitando que sejam destruídas pelo complexo ataque a membrana (MAC – membrane complex attack) (BARBOSA et al., 2009; VERMA et al., 2006).

A resposta adquirida se desenvolve a partir da segunda semana de infecção e é específica para o sorovar infectante (PINNA et al, 2010). A especificidade é conferida pelo LPS, que é altamente imunogênico (LEVETT, 2001). Os anticorpos específicos opsonizam as leptospiras, as quais são fagocitadas por macrófagos (MERIEN et al., 1997). Na fase aguda da leptospirose os cães desenvolvem título elevado de IgM. A proporção de anticorpos IgM e IgG na fase convalescente, após a imunestimulação, varia dependendo do sorovar (JESUS, 2009).

2.7 PATOGENIA

A patogenicidade de uma infecção por leptospirose depende se o hospedeiro é de manutenção ou acidental para o sorovar. Nos hospedeiros de manutenção, a leptospirose é determinada por uma redução da resposta sorológica, sutis sinais clínicos e demorado estado de portador renal que pode ser associado, com doença renal crônica. Nos hospedeiros acidentais, gera grave enfermidade, sendo relacionada a elevados títulos de anticorpos aglutinantes e um reduzido estado de portador renal (GOMES, 2013). Os ratos são os hospedeiros do sorovar *icterohaemorrhagiae*, mas os cães são frequentemente hospedeiros acidentais desse agente, porém são considerados reservatórios para o sorovar *canicola* (HAGIWARA, 2003), onde apresenta adaptação ao tecido renal canino, podendo ser eliminado por um longo período (TESSEROLLI, 2008).

Os cães tornam-se infectados pela exposição à urina contaminada de outros animais domésticos, de produção ou silvestres. A bactéria penetra através de membranas mucosas, solução de continuidade ou pele íntegra (sensibilizada por

contato prolongado com fontes de infecção como água e urina), causando danos endoteliais e a órgãos como fígado e rins (LANGONI, 2013).

As leptospiras alcançam a corrente sanguínea e órgãos parenquimatosos no 8º dia da infecção, esta se constitui a fase septicêmica onde ocorre a indução da formação de anticorpos que auxilia na destruição das leptospiras, constituindo a fase tóxica da doença. Caso ocorra sobrevivência dos microrganismos pela resposta imunológica, podem alojar-se em órgãos de tropismo como túbulos renais, útero, olhos e meninges (QUINN et al., 2005). Os animais que sobrevivem a fase aguda da doença, de leptospiremia, podem, em segundo estágio tornar-se carreadores assintomáticos, através da excreção urinária de leptospiras no meio ambiente. A fase crônica da doença, que se inicia por volta da segunda semana após o contato com a agente, geralmente é acompanhada da produção de anticorpos e leptospirúria (OLIVEIRA, 2010).

Garcia e Martins (2015) definiram que uma vez no hospedeiro, ocorrem duas fases distintas:

A) **Fase leptospirêmica:** fase de propagação do agente na corrente sanguínea e em vários órgãos (fígado, baço e rins, principalmente). Acontecem danos mecânicos em pequenos vasos, gerando hemorragias e trombos, que acarretam infartos teciduais. A icterícia pode aparecer especialmente devido à injúria hepática, e não à morte de hemácias. O rim pode iniciar problemas de filtração. O animal pode apresentar uremia com conseqüente hálito de amônia. Este é o quadro agudo da doença no homem e no cão. A extensão deste estágio é de aproximadamente 4 dias (raramente chega à 7 dias). Em outras espécies percebem-se somente problemas reprodutivos, porém tais problemas contribuem para a baixa produtividade da pecuária nacional e mundial, causando diminuição da fertilidade e abortamentos.

B) **Fase leptospirúrica:** é a etapa de imunidade, sendo caracterizada pela produção progressiva de anticorpos com estabelecimento das leptospiras em locais de difícil acesso aos mesmos. Geram massas nos túbulos contornados renais, na câmara anterior do globo ocular, no sistema reprodutivo (vesícula seminal, próstata, glândula bulbo-uretral). A leptospirúria pode ser descontínua e durar de meses a anos.

2.8 SINAIS CLÍNICOS

Os sinais clínicos da leptospirose, mesmo quando característicos, não são patognomônicos, o que impede que o diagnóstico clínico seja conclusivo (ANZAI, 2006). A exposição de animais susceptíveis ao serovar não adaptado a ele determina a doença acidental, aguda e grave, que normalmente se manifesta por infecções esporádicas ou em forma de surtos epidêmicos de leptospirose. Sorovares adaptados tendem a causar com doença crônica nos hospedeiros de manutenção (LÉON et al., 2006; NELSON e COUTO, 2006).

Os sinais clínicos da leptospirose canina irão depender da idade e da imunidade do hospedeiro, mas também dos fatores ambientais e da virulência do sorotipo infectante (SANTIM et al., 2006).

Em geral os sintomas clínicos observados são inespecíficos e variados. Apresenta-se de forma aguda, subaguda e crônica. Nas infecções agudas incluem-se sinais de anorexia, depressão, febre, vômito, desidratação, andar rígido e relutância em se movimentar, também chamada de mialgia generalizada e congestão de membranas mucosas (SHERDING, 2008). A presença de petéquias, equimoses, melena e epistaxe pode frequentemente acontecer em consequência da trombocitopenia e coagulação intravascular disseminada. Infecções superagudas podem rapidamente evoluir para a morte antes mesmo da doença hepática ou renal acentuada ser identificada (LAPPIN, 2006).

Nas infecções subagudas causam febre, anorexia, vômito, desidratação, poliúria, polidipsia, e mialgia. A deterioração da função renal progressiva resulta em oligúria ou anúria. Alguns cães podem apresentar icterícia. A maioria das infecções por leptospira em cães cursa de forma assintomática a crônica com quadros de insuficiência renal e hepática (GEISEN et. al., 2007).

De acordo com Jesus (2009) e Biesdorf et al (2008), a infecção causada pela *L. interrogans*, sorovar *icterohaemorrhagiae* caracteriza-se por doença hemorrágica aguda, insuficiência hepática e renal, resultando em febre, mialgia, prostração e diferentes graus de comprometimento renal. Já na doença causada pela *L. interrogans*, sorovar *canicola*, há o comprometimento renal, sem haver sinais hepáticos. São sinais predominantes de insuficiência renal progressiva e uremia: perda de peso, poliúria, desidratação, emese, diarreia (nem sempre), ulcerações na cavidade oral e necrose da língua, em casos mais avançados.

2.9 DIAGNÓSTICO

A identificação definitiva da leptospirose canina é baseada em uma combinação de informações clínico-epidemiológicas, achados laboratoriais e testes confirmatórios (GOMES, 2013).

2.9.1 DIAGNÓSTICO CLÍNICO

O diagnóstico inicial da leptospirose é realizado com base nos sinais clínicos, avaliação do histórico e contexto epidemiológico. As manifestações clínicas da leptospirose em cães dependem da idade, imunidade do animal e da virulência do sorovar infectante (SANTIM, et al. 2006). As infecções podem ser de forma aguda ou crônica, onde os sinais mais comuns são a insuficiência renal aguda, disfunção hepática e diátese hemorrágica (SOEK, 2012), sinais que mesmo quando característicos, não são patognomônicos, o que impede que o diagnóstico clínico seja conclusivo (ANZAI, 2006).

2.9.2 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

2.9.2.1 Hemograma e perfil bioquímico

Sherding (2008) preconiza que as alterações hematológicas envolvem leucopenia na fase superaguda em resposta inicial à leptospiremia, evoluindo para leucocitose neutrofílica com desvio à esquerda e trombocitopenia em casos mais graves, decorrente das anormalidades de coagulação ou CID (coagulação intravascular disseminada). Pode ocorrer ainda anemia regenerativa, por provável perda de sangue ou hemólise ou anemia arregenerativa, pela doença renal crônica (LAPPIN, 2006).

Em estudo realizado por Costa et al. (2013) sobre as alterações hematológicas, morfológicas e bioquímicas em um cão com leptospirose, verificaram um quadro de anemia, leucocitose, neutrofilia, o que indicou infecção aguda, além de trombocitopenia.

Os resultados bioquímicos indicam comprometimento renal e hepático pelo aumento da uréia e creatina, hiperbilirrubinemia, elevação das enzimas hepáticas (fosfatase alcalina e alanina aminotransferase), hiperfosfatemia, hipocalcemia ou hipercalemia (MILLER, et al., 2007).

Langoni et al. (2013) encontraram níveis de ureia e creatinina elevados em cães. O comprometimento renal, evidenciado pelo aumento de uréia e creatina é uma achado frequente nos casos de leptospirose canina aguda (KIOGICA, 2004)

2.9.2.2 Urinálise

O envolvimento renal pode levar a proteinúria branda e alterações leves no sedimento urinário, até insuficiência renal grave. Durante a fase septicêmica, eritrócitos, leucócitos e cilindros granulares estão geralmente presentes (VISITH & KEARKIAT, 2005).

Na urinálise de cães com leptospirose observam-se geralmente: densidade baixa, glicosúria, proteinúria, bilirrubinúria, que normalmente precede hiperbilirrubinemia, acompanhadas de presença de cilindros granulados, e elevação de leucócitos e eritrócitos no sedimento urinário (BIAZOTTI, 2006).

Na insuficiência renal aguda ocorre glicosúria normoglicêmica devido a presença de lesões tubulares significativas. Cilindros são detectados em cerca de 30% dos cães com insuficiência renal aguda, mas na sua ausência não exclui o diagnóstico de lesão parenquimatosa aguda (COWGILL & ELLIOT, 2004).

2.9.2.3 Microscopia de campo escuro

Jesus (2009) descreve que a microscopia de campo escuro aplica-se a observação de microrganismos vivos, sem preparação prévia. Formando uma imagem com contorno brilhante no campo microscópico, os raios luminosos são projetados obliquamente sobre o preparado pela ação do condensador cordióide e, quando encontram obstáculos com capacidade de desviá-los, como bactérias, são refratados e atingem a objetiva.

Para o diagnóstico da leptospirose canina, a microscopia de campo escuro de rotina deve ser limitada à urina. Outros líquidos corporais contêm artefatos similares

a leptospiras. Assim, centrifugação em velocidade reduzida limpa a amostra de partículas que interferem, mas não irá sedimentar leptospiras (HIRSH; CHUNG, 2003).

A amostra de urina durante a fase de leptospirúria permite a visualização direta de *Leptospiras* em microscópio de campo escuro, porém esta técnica apresenta limitações como: baixa sensibilidade, necessidade de experiência por parte do observador e principalmente a eliminação de *Leptospiras* de forma intermitente pela urina e lise pelo pH ácido da urina, que vão contribuir para um resultado falso. Contudo, resultados negativos desse exame não excluem a possibilidade do diagnóstico (ANZAI, 2006).

2.9.2.4 Soroaglutinação microscópica (SAM)

O SAM foi desenvolvido a quase 100 anos no Instituto Pasteur, e continua sendo considerado pela OMS como teste “ padrão ouro” para diagnóstico da leptospirose (PICARDEAU, 2014). Ele consiste em fazer reagir diluições do soro do paciente suspeito com suspensões de sorovares leptospirais vivos, que atuam como antígeno (CRODA et al., 2007). Após incubação, as misturas soro-antígeno são examinadas, através de microscopia de campo-escuro, para avaliar a presença de aglutinação e determinar, conseqüentemente, os títulos de anticorpos (SANTOS, 2011). O título é determinado como a maior diluição do soro em que 50% das bactérias se encontram aglutinadas, quando comparadas com o controle (PICARDEAU, 2013).

É um teste que possui alta sensibilidade e especificidade, porém só se torna útil após o início da fase imune da doença, por volta de 10 dias após o início da doença, quando começa a produção de anticorpos (MUSSO; LA SCOLA, 2013). Ele é capaz de detectar IgM e IgG e permite a identificação do sorogrupo infectante, mas não discrimina se os anticorpos produzidos são decorrentes de uma infecção ou de uma vacinação (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

De acordo com OIE (2014), na soroaglutinação microscópica, o soro suspeito deve ser confrontado com uma quantidade relevante de antígenos, entre os quais, possam estar presentes os exemplares dos principais sorogrupos patogênicos e de todos os sorovares correntes da localidade onde acontecem os casos. Brod et al.

(2005) relatam que os títulos de anticorpos normalmente são superiores em relação aos antígenos pertencentes a região onde estão acontecendo os surtos com as cepas de antígenos armazenados no laboratório, ainda que do mesmo sorogrupo, logo, um número considerável de sorovares deve ser utilizado no teste de diagnóstico para que sejam localizados sorovares pouco comuns ou não identificados até então.

Fatores importantes para interpretação de resultados sorológicos devem ser levados em consideração como a reação cruzada de anticorpos, títulos de anticorpos induzidos pela vacinação e dificuldade do consenso sobre quais títulos de anticorpos são indicativos da infecção ativa (MODOLO et al., 2006).

Silva et al. (2006) afirmam que vacinação ou prévia infecção estão associadas a títulos menores de 1:300. No entanto, títulos próximos a 1:800 de sorovares *canicola* e *icterohaemorrhagiae*, podem ser encontrados, mas não persistem mais que três meses após a vacinação. Alguns cães desenvolvem elevados títulos (aproximadamente 3.200), após vacinação com esses mesmos sorovares, e depois de um tempo, ocorre o declínio do título que pode persistir por até seis meses após a vacinação. As vacinas contra leptospirose, aplicadas rotineiramente nos cães domésticos, são capazes de protegê-los contra a doença, mas não contra o estado de portador renal.

Muitas vezes é necessária a elevação de quatro vezes no título para a confirmação sorológica da doença. Os títulos frequentemente são negativos na primeira semana, sendo necessária a obtenção de uma segunda ou terceira amostra a intervalos de duas a quatro semanas (GREENE, 2004; BURR; LUNN; YAM, 2009). Um único título não tem valor diagnóstico definitivo para infecção ativa, porém, um título em MAT de 1:400, ou superior, é indicativo de infecção, título 1:800, ou superior, é altamente indicativo de leptospirose (SHERDING, 2008).

A execução deste implica o cumprimento de vários requisitos pelo laboratório, entre os quais, a manutenção de culturas vivas de todos os sorovares, obrigando à constante subcultura de várias estirpes e, a verificação periódica de cada sorovar, devido ao risco continuado de contaminação das culturas de antígenos (LANÇA, 2011). Além disso, é necessária experiência profissional para realização da técnica e interpretação da mesma (SIQUEIRA, 2014).

2.9.2.5 Elisa

Testes baseados na técnica de Elisa vêm sendo amplamente aplicados, sendo Elisa-IgM o teste reconhecido pela OMS. Existem vários kits comerciais disponíveis no mercado, mas pode ser preparado no próprio laboratório a partir de culturas de leptospira, geralmente da espécie *biflexa* (WHO, 2003). É um teste muito sensível para detecção de anticorpos anti-leptospira, mas pouco específico para o diagnóstico do sorovar (BRASIL, 2005), porém permite diferenciar se os anticorpos detectados pelo MAT são de uma infecção corrente ou de uma imunização ativa prévia (MUSSO; LA SCOLA, 2013).

O princípio básico da técnica consiste na imobilização de um dos reagentes (anticorpo ou antígeno) em uma fase sólida. Após a adição da amostra, o outro reagente ligado a enzima reagirá com o complexo antígeno-anticorpo. Os imunocomplexos são revelados ao adicionar-se o substrato da enzima e um cromógeno formando um produto colorido. Os resultados de Elisa são expressos objetivamente pelas absorbâncias obtidas de espectrofotômetros, não dependendo de leituras subjetivas (CAVALCANTI et al, 2008).

Em um estudo realizado por Jimenez-Coelho et al. (2008) demonstraram uma correlação positiva de 96% entre os resultados da SAM e do ensaio imunoenzimático (ELISA), o qual apresentou boa sensibilidade e especificidade resultando em uma boa alternativa na detecção de anticorpos anti-*Leptospira* em soro de cão.

2.9.2.6 PCR (reação em cadeia pela polimerase)

A PCR é uma técnica que oferece o diagnóstico precoce da leptospirose, embora mais onerosa (TEIXEIRA et al., 2008). Pode ser utilizada na confirmação da doença, utilizando-se sangue, urina ou amostras de tecido (BOOMKENS et al., 2005). Como vantagens, a PCR apresenta boa sensibilidade e especificidade e pode ser utilizada como método diagnóstico no período inicial da doença, diferente do SAM que necessita de soroconversão (VAN DE MAELE et al., 2008).

Através da PCR pode-se amplificar, seletivamente, sequências alvos de DNA a partir de líquido e urina de pacientes com leptospirose (FONSECA et al., 2006). Porém, o método de PCR é limitado, já que a sonda utilizada é um fragmento de um

gene ribossomal, presente em leptospirosas patogênicas como não patogênicas (VIEIRA, 2008).

2.9.2.7 Diagnóstico anatomo - patológico

A necropsia de cães com leptospirose é caracterizada pela ocorrência de achados patológicos multissistêmicos. Icterícia em mucosas, pele, tecido subcutâneo e órgãos internos, são achados importantes no diagnóstico da leptospirose (Figura 4) (FIGHERA, 2008).

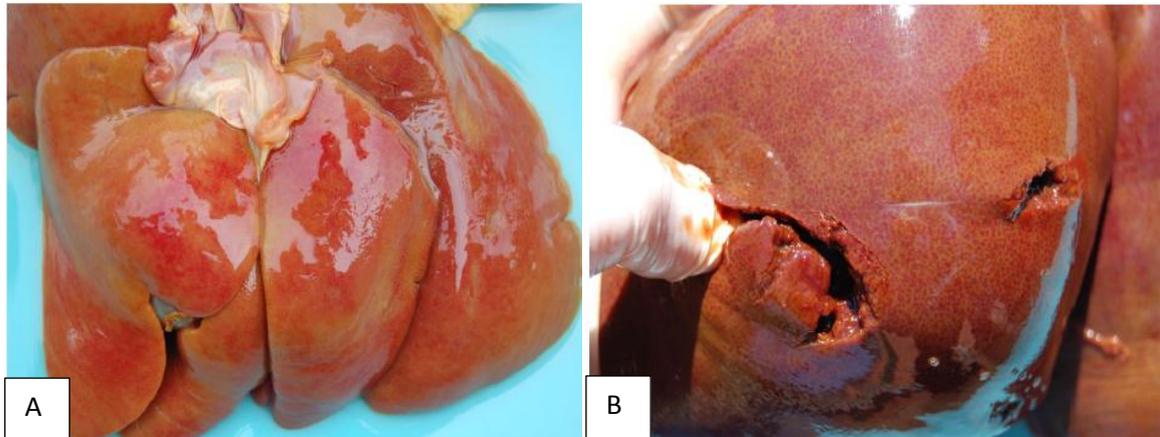
Figura 4 - Cães com leptospirose apresentando icterícia em diferentes locais anatômicos. A) Icterícia cutânea. B) Icterícia em mucosa oral. C) Esclera icterícia. D) Subcutâneo icterício no tecido adiposo



Fonte: OLIVEIRA, 2011

Macroscopicamente o fígado pode apresentar-se aumentado, friável e de coloração amarelada devido a colestase (Figura 5) (GREENE et al., 2006). No fígado, as lesões microscópicas são caracterizadas pela dissociação de hepatócitos, células binucleadas e com necrose discreta (VAN DEN INGH et al., 2006). Nefrite intersticial, degeneração e necrose são achados histológicos renais característicos da leptospirose (NEWMAN; CONFER; PANCIERA, 2009; SCHWEIGHAUSER et al., 2009). Também já foi descrita a ocorrência de aborto e infertilidade em cães como resultado de uma infecção transplacentária (ANDRÉ-FONTAINE, 2006).

Figura 5 - Fígados de cães com leptospirose. A) fígado icterico com bordos arredondados. B) fígado icterico com padrão lobular e friável ao toque



Fonte: OLIVEIRA, 2011

Guidi (2006) demonstra que nos cães observa-se, principalmente, hepatomegalia, degeneração e fibrose hepática, em pulmões, congestão, petéquias e sufusões pleurais, úlceras na língua, edema, congestão e necrose renal, hemorragias e aderência de cápsula renal, congestão, edema e hemorragias gastro-intestinais.

Montenegro et al. (2010) observaram em necropsia realizada em cão com leptospirose, pulmões com petéquias, sulfusões, equimoses, congestão, hemorragia e enfisema, no fígado foi encontrado embebição pela bile, pseudomelanose e a vesícula biliar estava enegrecida, havia também esplenomegalia de coloração pálida. As paredes de estômago e intestino delgado apresentavam pontos hemorrágicos. Ao examinar o sistema urinário, foram observadas aderências na cápsula de ambos os rins, congestão nas áreas cortical e medular do rim direito, e congestão apenas na área medular do rim esquerdo. A bexiga estava bastante repleta, com urina de coloração avermelhada e com presença de pequenos coágulos, além de sua parede interna apresentar petéquias.

Após a necropsia dos animais, os rins e fígado são os órgãos de escolha para identificação do agente. Assim, nesses animais o diagnóstico histopatológico é realizado principalmente a partir de fragmentos desses órgãos, corados por técnicas de impregnação pela prata (JESUS, 2009).

2.9.2.8 Cultivo e isolamento do agente

A cultura de leptospiras é extremamente exigente, sendo que são necessárias inúmeras diluições, vários meios de cultura e análises periódicas a estas, para assegurar o crescimento do microrganismo. Este método é muito difícil, muito demorado e exige uma avançada técnica laboratorial, sendo que poucos laboratórios podem prestar este serviço. Especial atenção deve ser tomada para que a amostra recolhida anteceda o início de antibioterapia, e no caso de a amostra ser urina, fazer várias recolhas intercaladas, devido à excreção intermitente da bactéria (Burr, Lunn, & Yam, 2009).

As leptospiras podem ser isoladas do sangue, tecidos, e LCR durante os primeiros 7 a 10 dias da doença e da urina durante a segunda a terceira semana da doença. A técnica possui baixa sensibilidade (14,3-50%) e requer de 4 a 15 semanas para ser finalizada em função do crescimento fastidioso das leptospiras (BROWN *et al.*, 2003). O meio de cultura com o material inoculado precisa ser submetido a análises por microscopia de campo escuro semanalmente por um período de até três meses. Mesmo com as limitações listadas acima, o isolamento do patógeno é importante, pois além de fornecer o diagnóstico definitivo, permite identificação do sorogrupo e sorovar do isolado. Esses dados têm utilidade epidemiológica por sugerirem potencial reservatórios animais na natureza, guiando assim estratégias de controle e prevenção (MCBRIDE *et al.*, 2005).

2.9.3 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Os diagnósticos diferenciais da leptospirose no cão podem ser a dirofilariose, anemia hemolítica imunomediada, bacteremia/sepsis (ferimentos por mordedura, prostatite, endocardite, doença dentária), hepatite canina infecciosa e herpesvirose canina; neoplasia hepática, traumatismo, lúpus eritematoso sistêmico, erliquiose, toxoplasmose, neoplasia renal e cálculos renais (McDONOUGH, 2008).

2.10 TRATAMENTO

O tratamento de um cão com leptospirose consiste em duas componentes principais, a terapia de suporte e a terapia específica (HARKIN, 2008). É importante referir que, na leptospirose, a antibioterapia passa por duas fases. A primeira

durante a fase aguda da doença, cujo objectivo é eliminar a leptospiremia. A segunda administrada durante a convalescença, que pretende evitar a fase de colonização renal pelas leptospiras, contribuindo para que o animal não se torne um disseminador da doença através da sua urina (LANÇA, 2012). A terapia de suporte para os animais com leptospirose vai depender da gravidade da infecção, da presença ou não da disfunção renal ou hepática e de outros fatores complicantes (GREENE, 2004).

Andrade (2008) descreve que o principal objetivo do tratamento durante a fase aguda da doença é manter o paciente estável e prevenir a extensão das lesões no fígado e rins, além de suprimir a leptospinúria. Os animais em fase aguda necessitam de terapia intensiva de suporte dependendo da severidade do quadro. A fluidoterapia é requerida para a maioria dos caninos; a diurese intensa pode ser necessária por causa do envolvimento renal e o uso de antibióticos inibe a multiplicação destes organismos reduzindo complicações. Em alguns casos de leptospirose hemorrágica, pode ser necessária a transfusão de plaquetas ou sangue total (GREENE et al., 2006).

A antibioticoterapia deve ser iniciada o quanto antes, pois inibe rapidamente as complicações fatais da infecção como insuficiência renal e hepática. A penicilina e seus derivados é o antibiótico de escolha para interromper a leptospiremia, porém não elimina o estado de portador. Após a recuperação, a doxiciclina pode ser usada para a eliminação desse estado (RODRIGUES, 2008).

De acordo com Sherding (2008) para a leptospiremia, são administrados antibióticos por via parenteral, como a penicilina G (25.000 a 40.000 UI/kg, BID, IV) ou ampicilina (22mg/kg, TID, IV), durante duas semanas. Para eliminar a condição de portador renal, deve ser administrado doxiciclina (5mg/kg, BID, VO) durante duas semanas. Outras alternativas, incluem os macrolídeos (eritromicina, azitromicina), fluoroquinolonas ou aminoglicosídeos, este último que deve ser evitado em cães com disfunção renal.

Durante a fase aguda da infecção, algumas quinolonas têm efeito contra *Leptospiras* e podem ser usadas em combinação com penicilina. A ampicilina e a enrofloxacin foram concomitantemente usadas em estudos, no qual 83% dos caninos infectados obtiveram cura (LAPPIN, 2006).

2.11 PREVENÇÃO E CONTROLE

Para a prevenção da leptospirose, tanto humana quanto canina, é preciso à implantação de uma série de medidas de controle, como o controle da população de roedores, a manutenção de ambiente desfavorável à sobrevivência das leptospiras, e isolamento e tratamento dos animais infectados, além de se evitar o contato com água da enchente para que não ocorra a disseminação das leptospiras (RODRIGUES, 2008). Jorge et al. (2011) ressaltaram a importância sobre o esclarecimento da população do local quanto à epidemiologia da leptospirose e a importância da prevenção, através de medidas sanitárias aplicadas ao ambiente e aos animais de estimação.

De acordo com o Ministério da Saúde (2010), algumas medidas devem ser adotadas para a prevenção da leptospirose humana:

- Controle de roedores: através de medidas de antirratização;
- Coleta, acondicionamento e destino adequado do lixo, principal fonte de alimento para roedores;
- Manutenção de terrenos baldios, públicos ou privados, murados e livres de mato e entulhos, evitando condições à instalação de roedores;
- Eliminação de entulho, materiais de construção ou objetos em desuso;
- Consumo de água potável, filtrada, fervida ou clorada;
- Limpeza e desinfecção adequada de reservatórios domésticos de água;
- Descarte de alimentos que entrarem em contato com águas contaminadas;
- Limpeza e desinfecção de áreas domiciliares que sofreram inundação recente;
- Desassoreamento, limpeza e canalização de córregos;
- Aplicação de técnicas de drenagem de águas livres supostamente contaminadas;
- Desenvolvimento e revisão permanente das galerias de águas pluviais e esgoto urbano;
- Medidas de proteção individual para trabalhadores ou indivíduos expostos ao risco, através do uso de equipamentos de proteção individual como luvas e botas;
- Diminuição do risco de exposição de ferimentos às águas/lama de enchentes ou outra situação de risco;
- Vacinação de animais domésticos (uso veterinário).

Lappin et al. (2006) abordaram como é impossível controlar a liberação de *Leptospiras* pelos animais selvagens, a vacinação dos cães é essencial. As

bactérias bivalentes que contém dois sorotipos principais, a *L. canicola* e a *L. icterohaemorrhagiae*, estão disponíveis para os cães. Pelo fato dos títulos superiores serem produzidos por múltiplas injeções, vacinações semestrais devem ser administradas aos cães em áreas endêmicas, e todos os cães devem receber no mínimo três doses, com intervalo de três a quatro semanas, em seu programa de vacinação inicial.

As vacinas disponíveis atualmente no mercado brasileiro caracterizam-se por serem provenientes de culturas de leptospiras inativadas acrescidas de adjuvantes compostas pelos sorovares mais prevalentes em estudos efetuados no país. Para os cães encontram-se disponíveis vacinas polivalentes como a óctupla (V8) composta por dois sorovares (*Icterohaemorrhagiae* e *Canicola*), déctupla (V10) com quatro sorovares (*Icterohaemorrhagiae*, *Canicola*, *Grippotyphosa* e *Pomona*), undéctupla (V11) com cinco sorovares (com o sorovar *Conpenhageni* a mais que a V10) e a V12 (acrescido pelos sorovares *Hardjo* e *Pyrogenes* em relação à V11) (CASTRO et al., 2010).

A imunização é eficaz em reduzir a prevalência e a gravidade da leptospirose canina, mas não evita o estado de carreador, nem protege contra a infecção por outros sorotipos que não estão contidos na preparação vacinal (JESUS, 2009).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAIS

- O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo soro-epidemiológico da leptospirose canina em amostras de cães domiciliados no município de Cruz das Almas – BA

3.2 ESPECÍFICOS

- Aplicar inquérito epidemiológico sobre a Leptospirose canina na zona urbana da cidade de Cruz das Almas, Bahia;
- Definir perfil epidemiológico da população investigada;
- Estabelecer rotina de diagnóstico sorológico da leptospirose através do cultivo e manutenção das cepas de *Leptospiras* ssp. no Laboratório de Doenças Infecciosas da UFRB.
- Analisar os resultados obtidos através de avaliação estatística.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LOCAL DE ESTUDO

A pesquisa foi realizada no município de Cruz das Almas, situada na Região do Recôncavo Baiano, Brasil (Figura 6). O município possui uma população estimada de 64, 197 habitantes (IBGE, 2015). Apresenta índice pluviométrico anual médio de 1240 mm, umidade relativa do ar anual de 80% e altitude de 220 m acima do mar (EMBRAPA, 2010). As amostras foram provenientes de bairros aleatórios da zona urbana, sendo o Inocoop, Tabela, Areal e Estrada de ferro.

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), protocolo nº 23007.004595/2016-83, seguindo os Princípios Éticos na Experimentação Animal (ANEXO 1).

Figura 6 - Localização geográfica do município de Cruz das Almas, Bahia, Brasil



Fonte: <http://www.massapeimoveis.com.br/mapas.php>, 2015

4.2 COLETA DAS AMOSTRAS

Foram coletadas amostras de sangue de 200 cães (*Canis familiaris*) domiciliados durante o período fev./2015 a dez./2015. A amostra colhida foi calculada com base na população total de cães da cidade, estimada a partir da população humana de 64, 197 MIL habitantes. Para o cálculo da proporção cão: homem, foi utilizada uma relação de 1:10 (REICHMANN et al, 1999), que redundou em um total de 6420 cães. O tamanho da amostra foi calculado através da seguinte fórmula (TRIOLA, 1999; BALBINOT et al., 2012):

$$n = \frac{N \cdot Z^2 \cdot p \cdot (1-p)}{Z^2 \cdot p \cdot (1-p) + e^2 \cdot (N-1)}$$

Onde, n : número de indivíduos da amostra; N : população total; Z : intervalo de confiança; p : proporção estimada (prevalência); e : erro amostral.

O intervalo de confiança foi de 95%, a proporção estimada de 85% (VIEGAS et al., 2001) e a margem de erro de 5%, resultando no n amostral de 190 cães, por motivo de segurança foram colhidas 200 amostras.

Antes de iniciar a coleta, um termo de consentimento e esclarecimento (ANEXO 2) foi fornecido ao proprietário com o intuito de informá-lo sobre o estudo e procedimentos que seriam realizados, após autorização procedia-se a coleta das amostras .

O animal foi contido, com auxílio do responsável, sendo colocado em uma superfície não escorregadia, em seguida, o executor falou em tom calmo com o animal passando a mão sobre o seu dorso para conquistar sua confiança, após isso, colocou-se uma mordação para impedir sua tentativa de defesa. Não foi preciso realizar tricotomia da região, a veia (cefálica ou jugular) foi localizada, feita antissepsia com álcool a 70% e puncionada utilizando seringas descartáveis de 3 mL e agulhas estéreis (Figura 7).

As amostras de sangue foram despejadas cuidadosamente em um tubo sem anticoagulante, identificadas e levadas sob refrigeração ao Laboratório de Doenças Infecciosas (LDI) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, onde passaram por centrifugação a 3000 rpm, sendo o soro acondicionado em tubos tipo eppendorf a 20°C negativos para posterior análise sorológica.

Figura 7 – Contenção e coleta de sangue por punção da veia cefálica dos cães domiciliados da cidade de Cruz das Almas, Bahia, Brasil



Fonte: arquivo pessoal, 2015

4.3 QUESTIONÁRIO

Os responsáveis pelos cães responderam um questionário epidemiológico com duas opções de respostas, elaborado com o intuito de verificar a ausência ou presença de algumas práticas e condições que atuem como possíveis fatores de risco para a leptospirose canina (Figura 8).

O proprietário respondeu o questionário referente a cada cão do qual foi colhida a amostra de sangue, sendo a entrevista realizada face a face. Para não haver superestimativa dos dados aplicou-se um questionário por casa. Foram investigados dados referentes ao animal, ao responsável e ao meio ambiente (ANEXO 3).

Figura 8 - Aplicação de questionário aos proprietários da cidade de Cruz das Almas, Bahia, Brasil



Fonte: arquivo pessoal, 2015

4.4 SOROLOGIA

As amostras de soro foram submetidas à prova de Soro aglutinação Microscópica (SAM) utilizando-se de uma coleção de antígenos vivos com 19 variantes sorológicas de leptospiros. Os sorovares utilizados foram: *Icterohaemorrhagiae*, *Copenhageni*, *Canicola*, *Grippotyphosa*, *Pomona*, *Australis*, *Bataviae*, *Castellonis*, *Cynopteri*, *Javanica*, *Panama*, *Pyrogenes*, *Hardjo*, *Sejroe*, *Patoc* (saprófita), *Tarassovi*, *Autumnalis*, *Hebdomadis*, *Wolffi*, cedidas em convênio com o laboratório de referência para a leptospirose a Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz. A bateria de cepa de leptospiros utilizada nessa pesquisa está detalhada na Tabela 1.

Tabela 1: Demonstração dos sorogrupos e variantes sorológicas das leptospiras

Sorogrupo	Variante do sorogrupo
<i>Icterohaemorrhagiae</i>	<i>icterohaemorrhagiae</i>
<i>Icterohaemorrhagiae</i>	<i>copenhageni</i>
<i>Canicola</i>	<i>canicola,</i>
<i>Grippotyphosa</i>	<i>grippotyphosa</i>
<i>Pomona</i>	<i>pomona</i>
<i>Australis</i>	<i>australis</i>
<i>Bataviae</i>	<i>bataviae</i>
<i>Ballum</i>	<i>castellonis</i>
<i>Cynopteri</i>	<i>cynopteri</i>
<i>Javanica</i>	<i>javanica</i>
<i>Panama</i>	<i>panama</i>
<i>Pyrogenes</i>	<i>pyrogenes</i>
<i>Sejroe</i>	<i>hardjo</i>
<i>Sejroe</i>	<i>sejroe</i>
<i>Semarang</i>	<i>patoc</i>
<i>Tarassovi</i>	<i>tarassovi</i>
<i>Autumnalis</i>	<i>autumnalis</i>
<i>Hebdomadis</i>	<i>hebdomadis</i>
<i>Sejroe</i>	<i>wolffi</i>

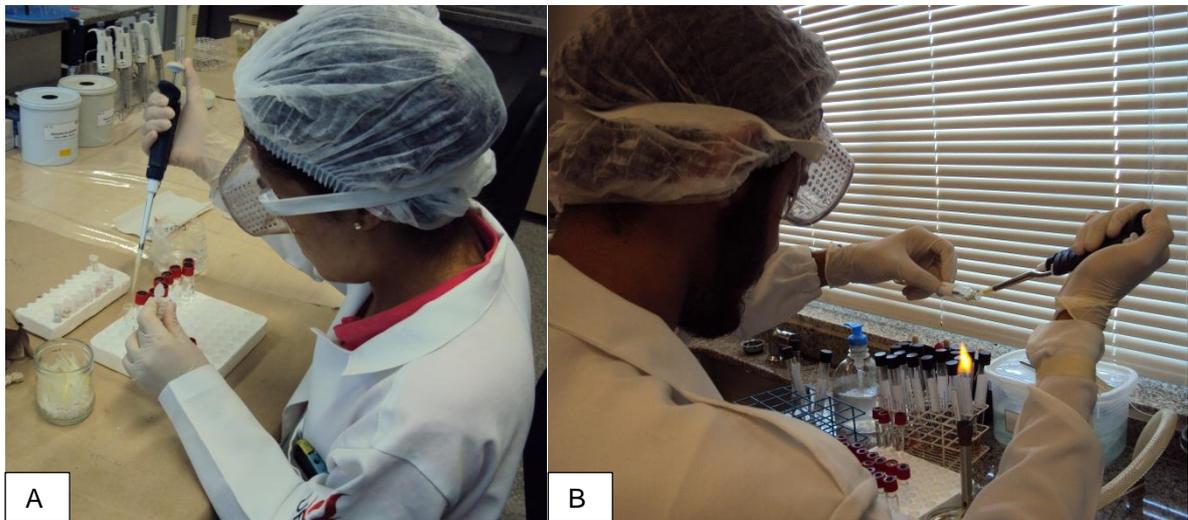
Fonte: Elaboração da autora, 2016

Os antígenos foram preparados a partir de matrizes mantidas no LDI da UFRB, repicadas quinzenalmente em meio de cultura EMJH (Difco®), enriquecido com 10% de soro de coelho, mantido em estufa a 30°C, livres de contaminação e de auto aglutinação. Para determinação dos cães sororreagentes, foi utilizada a diluição de $\geq 1:100$, considerando-se amostras reagentes, as quais apresentaram aglutinação igual ou superior a 50%.

4.4.1 Triagem

O soro dos cães foram diluídos a 1:100, sendo pipetados em tubos estéreis 0,2 ml de soro em 4,8 ml de NaCl 0,85% estéril. As cepas de leptospiras foram pipetadas em tubos estéreis, evitando a contaminação das cepas, 0,2 ml de cada sorovar em 4,8 ml de NaCl 0,85% estéril, sempre homogeneizando os tubos (Figura 9).

Figura 9 – Diluição das amostras de soro canino (A) e diluição das cepas de leptospira(B)



Fonte: arquivo pessoal, 2015

Foram adicionados 200 μ l da diluição do soro nos 19 eppendorfs para cada amostra, sempre homogeneizando e logo em seguida 200 μ l da suspensão antigênica nos eppendorfs. Ao termino desse processo, as amostras eram mantidas em estufa bacteriológica a 37° por 3 horas, a fim de se obter a aglutinação do sorovar com o soro do animal testado.

Para leitura, as lâminas foram lavadas com solução detergente, secas, identificadas com o número de cada amostra, sendo poços marcados com hidrocor, no sentido de facilitar o momento da leitura.

Após o período de incubação, foram pipetadas 30 μ l das amostras testes nas lâminas (Figura 10) para observação de aglutinação em microscopia de contraste de fase, para seleção dos soros que aglutinaram mais de 50% das *Leptospiras*. Os soros que apresentaram reação positiva para um determinado sorovar foram novamente congelados para posteriormente serem utilizados na titulação juntamente com o sorovar reagente.

Figura 10 - Distribuição das amostras de soro canino na lâmina previamente preparada

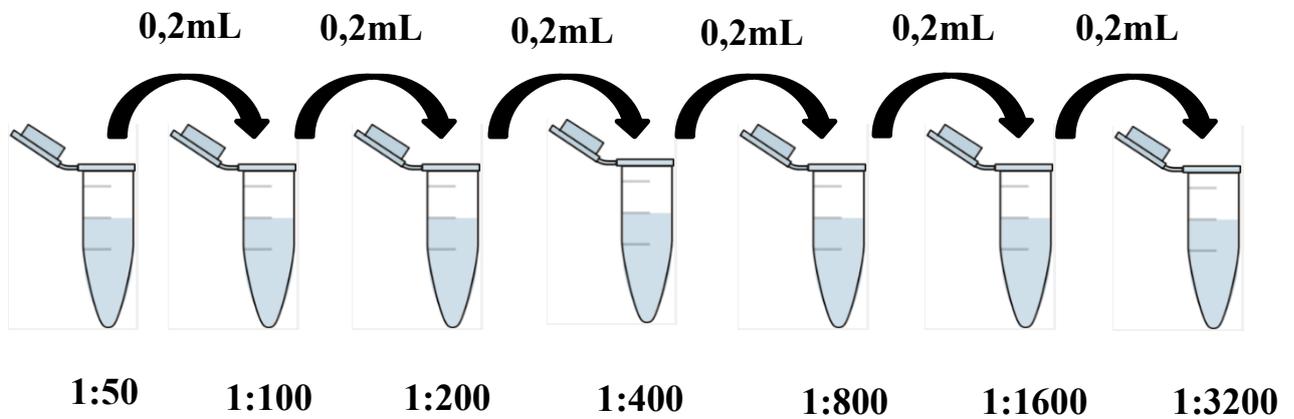


Fonte: arquivo pessoal, 2015

4.4.2 Titulação

A titulação foi realizada com as amostras selecionadas da triagem. Os soros sofreram uma diluição de 1:50 em solução salina (NaCl 0,85%) na quantidade de 4,9 ml de solução salina para 0,1 ml do soro. Em seguida, foi removido da diluição 0,2 ml com uma micropipeta e colocado em um eppendorf que recebeu a identificação do título de 100 e mais 0,2 ml do antígeno foi adicionado nesse mesmo eppendorf. Um segundo eppendorf, identificado com a numeração do título de 200, recebeu 0,2 ml da mistura do 1º eppendorf e mais 0,2 ml do antígeno. No 3º eppendorf com a identificação do título de 400, recebeu 0,2 ml do 2º eppendorf mais 0,2 ml do antígeno. O 4º eppendorf com a identificação do título de 800, recebeu 0,2 ml da diluição do 3º eppendorf e mais 0,2 ml do antígeno. O 5º eppendorf representando uma titulação de 1600 recebeu 0,2 ml do antígeno e mais 0,2 ml da diluição do 4º eppendorf. Seguiram-se estes procedimentos até a titulação 3200 (Figura 11). Todo o procedimento foi realizado em todos os soros separadamente, utilizando os sorovares que havia sido positivo para determinado soro no teste de triagem. Para a realização da leitura da aglutinação, foram removidos 30 µl de cada eppendorf e postos em lâminas e encaminhadas à microscopia em contraste de fase.

Figura 11 – Exemplificação das titulações realizadas com as amostras de soro sanguíneo separadas na triagem



Fonte: Elaboração da autora, 2016

4.5 ESTUDO ESTATÍSTICO

As informações obtidas foram armazenadas em banco de dados da planilha do Excel (versão 2010), na qual a distribuição de frequência foi calculada. Para análise, buscou-se verificar a existência de diferença significativa entre as variáveis estudadas e a presença de anticorpos anti-leptospira, para isso foi realizado o teste do Qui-quadrado ($\alpha \leq 0,05$ – Exato de Fischer), *odds ratio* e intervalo de confiança mediante software estatístico IBM SPSS Statistics (versão 20.0).

5 RESULTADOS

Das 200 amostras de soro canino analisadas, 60 apresentaram resultados considerados positivos para leptospirose, com títulos ≥ 100 , obtendo-se uma prevalência de 30%. Na Tabela 2 é apresentado o número de amostras de soro de cães reagentes e suas respectivas titulações, onde foi possível observar que o sorovar *javanica* foi o mais frequente, com seis (15,4%) amostras positivas, seguido dos sorovares *castellonis*, *hardjo*, *sejroe* e *tarassovi* com três (7,7%) amostras positivas. Também foram encontrados os sorovares *icterohaemorrhagiae*, *canicola*, *grippothyphosa*, *cynopteri*, *panama*, *pyrogenes*, *patoc* e *hebdomadis* com dois soros reagentes (5,1%) e os sorovares *copenhageni*, *pomona*, *bataviae*, *autumnalis* e *wolffi* com uma (2,6%) amostra positiva.

Tabela 2 - Frequência da positividade de amostras sorológicas de cães da cidade de Cruz das Almas, Bahia, Brasil, ao teste de SAM, segundo o sorovar reagente e o título obtido.

Sorovar	Títulos						Total (%)
	1-100	1-200	1-400	1-800	1-1600	1-3200	
1. <i>Icterohaemorrhagiae</i>	1	0	0	1	0	0	2 5,1%
2. <i>Copenhageni</i>	1	0	0	0	0	0	1 2,6%
3. <i>Canicola</i>	1	0	1	0	0	0	2 5,1%
4. <i>Grippothyphosa</i>	1	0	1	0	0	0	2 5,1%
5. <i>Pomona</i>	0	0	1	0	0	0	1 2,6%
6. <i>Australis</i>	0	0	0	0	0	0	0 0,0%
7. <i>Bataviae</i>	1	0	0	0	0	0	1 2,6%
8. <i>Castellonis</i>	1	1	0	0	1	0	3 7,7%
9. <i>Cynopteri</i>	0	0	0	0	1	1	2 5,1%
10. <i>Javanica</i>	2	1	1	1	1	0	6 15,4%
11. <i>Panama</i>	1	0	0	1	0	0	2 5,1%
12. <i>Pyrogenes</i>	1	1	0	0	0	0	2 5,1%
13. <i>Hardjo</i>	1	0	1	1	0	0	3 7,7%
14. <i>Sejroe</i>	1	0	1	1	0	0	3 7,7%
15. <i>Patoc</i>	0	0	0	2	0	0	2 5,1%
16. <i>Tarassovi</i>	1	1	0	0	1	0	3 7,7%
17. <i>Autumnalis</i>	1	0	0	0	0	0	1 2,6%
18. <i>Hebdomadis</i>	0	1	0	1	0	0	2 5,1%
19. <i>Wolffi</i>	1	0	0	0	0	0	1 2,6%
Total	15	5	6	8	4	1	39 100,0%

Foi considerado positivo o sorovar com maior titulação. Nesta tabela não constam as coagglutinações (vide Tabela 3). Fonte: Elaboração da autora.

Dos 60 cães soropositivos, 21 apresentaram coaglutinação, isto é, quando mais de uma variante sorológica demonstrou titulação para uma mesma amostra de soro, conforme verificado na Tabela 3.

Tabela 3 – Distribuição dos maiores títulos de anticorpos contra *Leptospira* spp. com coaglutinações, em cães da cidade de Cruz das Almas, Bahia, Brasil.

Sorovar	Títulos						Total (%)
	1-100	1-200	1-400	1-800	1-1600	1-3200	
<i>Ictero./hardjo</i>	1	0	0	0	0	0	1 4,8%
<i>Copenh./Batavi./Cynopt./Sejroe</i>	1	0	0	0	0	0	1 4,8%
<i>Canico./panama</i>	0	0	0	0	1	0	1 4,8%
<i>Panama/sejroe</i>	1	0	0	0	0	0	1 4,8%
<i>Pomona/Castell.</i>	1	0	0	0	0	0	1 4,8%
<i>Batavi./wolffi</i>	0	0	1	0	0	0	1 4,8%
<i>Ictero./copenh./canico./grippa.</i>	1	0	0	0	0	0	1 4,8%
<i>Copenh./Pomona</i>	0	0	0	1	0	0	1 4,8%
<i>Cynopt./copenh.</i>	1	0	0	0	0	0	1 4,8%
<i>Javani./castell./panama/patoc</i>	1	0	0	0	0	0	1 4,8%
<i>Panama/ictero./grippa.</i>	1	0	0	0	0	0	1 4,8%
<i>Pyroge./castel.</i>	0	1	0	0	0	0	1 4,8%
<i>Copenh./canico.</i>	0	0	1	0	0	0	1 4,8%
<i>Sejroe/copenh./patoc</i>	1	0	0	0	0	0	1 4,8%
<i>Patoc/hebdom.</i>	0	1	0	0	0	0	1 4,8%
<i>Tarass./patoc</i>	0	0	1	0	0	0	1 4,8%
<i>Autumn./patoc</i>	1	0	0	0	0	0	1 4,8%
<i>Panama/patoc</i>	1	0	0	0	0	0	1 4,8%
<i>Wolffi/patoc</i>	1	0	0	0	0	0	1 4,8%
<i>Pomona/wolffi</i>	1	0	0	0	0	0	1 4,8%
<i>Copenh./batavi.</i>	0	0	0	1	0	0	1 4,8%
Total	13	2	3	2	1	0	21 100,0%

Fonte: elaboração da autora.

Em relação aos resultados da associação entre as variáveis epidemiológicas e a detecção de anticorpos anti-leptospira, o parâmetro que revelou significância quando contrastada com a soropositividade para leptospirose foi a idade de 6 meses a 5 anos (OR= 2,5; $p= 0,022$). As outras variáveis não apresentaram diferença estatística, porém são relevantes para os resultados desta pesquisa, como vacina para leptospirose, onde 90% dos animais não são vacinados, 67,5% das pessoas não levam o cão ao veterinário, 90,5% dormem do lado de fora da casa e 73,5% possuem contato com outros animais, conforme exibido na Tabela 4.

Tabela 4 – Resultados da associação das variáveis epidemiológicas e a detecção de anticorpos anti-leptospira, com respectivos valores de odds ration, intervalo de confiança (IC) e a significância ($\alpha \leq 0,05$), realizado na cidade de Cruz das Almas, Bahia, Brasil.

Variáveis	Sorologia 1:100				
	Positivo (%)	Negativo (%)	Odds Ratio	IC 95%	p-Valor
IDADE					
6 meses - 5 anos	25,5	48,5	2,5	1,14 - 5,56	0,022*
> 5 anos	4,5	21,5			
RAÇA					
SRD	26,5	58,0	1,6	0,64 - 3,86	0,398
Definida	3,5	12,0			
SEXO					
Masculino	16,0	37,0	1,1	0,56 - 1,87	1
Feminino	14,0	33,0			
PROCEDÊNCIA					
Adoção	27,5	64,0	1	0,35 - 3,1	1
Comprado	2,5	6,0			
PRESENÇA DE RATO					
Sim	22,0	49,5	1,2	0,58 - 2,27	0,735
Não	8,0	20,5			
TRAMENTO DE ESGOTO					
Sim	24,5	56,5	1,1	0,49 - 2,32	1
Não	5,5	13,5			
DESTINO DO LIXO					
Coleta da prefeitura	26,5	65,5	0,5	0,18 - 1,47	0,256
Depósito em local aberto	3,5	4,5			
ACESSO A RUA					
Sim	17,0	47,0	0,6	0,34 - 1,19	0,198
Não	13,0	23,0			
VACINA PARA LEPTOSPIROSE					
Sim	3,5	6,5	1,3	0,49 - 3,42	0,613
Não	26,5	63,5			
VAI AO VETERINÁRIO					
Sim	11,0	21,5	1,3	0,69 - 2,47	0,415
Não	19,0	48,5			
ONDE DORME A NOITE					
Dentro de casa	3,0	6,5	1,1	0,39 - 3	1
Fora de casa	27,0	63,5			
ALIMENTAÇÃO					
Fica a vontade	8,0	25,5	0,64	0,33 - 1,24	0,195
Obedece a horários	22,0	44,5			
CONTATO COM OUTROS ANIMAIS					
Sim	23,0	50,5	1,27	0,63 - 2,56	0,601
Não	7,0	19,5			
HÁBITOS DE CAÇAR					
Sim	14,5	34,5	0,96	0,53 - 1,76	1
Não	15,5	35,5			
ÁREAS FREQUENTADAS					
Zona urbana	28,0	64,5	1,19	0,36 - 3,91	1
Zona rural	2,0	5,5			

TIPO DE ALIMENTAÇÃO					
Ração	8,0	19,0			
Outros	22,0	51,0	0,98	0,49 - 1,93	1
MEXER NO LIXO					
Sim	12,0	28,5			
Não	18,0	41,5	0,97	0,52 - 1,80	1
VERMIFUGAÇÃO					
Sim	21,0	47,5			
Não	9,0	22,5	1,11	0,57 - 2,13	0,868
CONHECIMENTO DA DOENÇA					
Sim	16,5	41,0			
Não	13,5	29,0	0,86	0,47 - 1,59	0,643
ORIGEM DA ÁGUA					
Bebedouro	23,5	52,5			
Outros	6,5	17,5	1,21	0,59 - 2,49	0,719
USO DE RATICIDA					
Sim	10,0	24,5			
Não	20,0	45,5	0,97	0,51 - 1,85	1
PRESENÇA DE GATO					
Sim	19,0	39,0			
Não	11,0	31,0	0,73	0,39 - 1,36	0,351

*p ≤ 0,05. Fonte: elaboração da autora

Ao incorporar cada uma das variáveis em estudo com a idade, encontrou-se significância estatística para presença de roedores (OR= 2,19; p= 0,020), acesso a rua (OR= 1,88; p= 0,029) e o não uso de raticida (OR= 1,63; p= 0,044), como mostrado na tabela 5.

Tabela 5 – Resultado das variáveis que apresentaram significância estatística em associação com a variável idade e respectivos valores de *odds ratio*, intervalo de confiança (IC) e significância ($\alpha \leq 0,05$).

Variáveis	Idade		Odds Ratio	IC 95%	p-Valor
	6 meses - 5 anos (%)	> 5 anos (%)			
PRESENÇA DE RATO					
Sim	49,5	22,0	2,19	1,10 - 4,36	0,020*
Não	24,5	4,0			
ACESSO A RUA					
Sim	44,0	20,0	1,88	1,05 - 3,34	0,029*
Não	30,0	6,0			
USO DE RATICIDA					
Sim	22,5	12,0	1,63	1,03 - 2,58	0,044*
Não	51,5	14,0			

*p ≤ 0,05. Fonte: elaboração da autora.

6 DISCUSSÃO

A soropositividade (30%) para a leptospirose em cães domiciliados da cidade de Cruz das Almas - BA foi semelhante aos resultados encontrados por Tesseroli et al. (2008) que relataram prevalência de 32,27% em cães domiciliados de Curitiba, PR. Taxas de prevalências menores do que o presente estudo também foram demonstradas por Azevedo et al. (2011) que encontraram 19,74% de positividade em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande, em Patos e por Benitez et al. (2010) em cães errantes localizados no campus da Universidade Estadual de Londrina, PR, com 21,21% de animais positivos. Taxas elevadas foram relatadas por Castro et al. (2011), com 38% de positividade em Uberlândia, MG e por Freire et al. (2007), no Rio de Janeiro, que obteve 73,3% de cães soropositivos para leptospirose.

Em todas as pesquisas citadas houve uma diferença da quantidade de amostras e sorovares utilizados para realização da prova de soroaglutinação microscópica, porém demonstra a grande variabilidade em relação à frequência da soroprevalência desta enfermidade em diversas regiões do Brasil (SOUZA et al., 2008).

Esse fato pode ser explicado pela variedade de fatores que influenciam na ocorrência da doença, tais como: topografia, estação do ano (SILVA et al., 2009), temperatura, índice pluviométrico, reservatórios domésticos e silvestres (SYKES et al., 2011).

Dentre os sorovares pesquisados, o de maior ocorrência foi o *javanica* (15,4%). Diversos trabalhos pesquisados não demonstraram a soroprevalência para o sorovar *javanica* em cães, como verificado por Lemos et al. (2010), Silva et al. (2006), Fernandes et al. (2013), Azevedo et al. (2011), Alves et al. (2000), Aguiar et al. (2007) e Benitez et al. (2010).

Há relatos de sua detecção em cães pertencentes um bairro de Botucatu – SP, com 2,78% de soropositividade (FACCIOLI et al, 2007), na região de Patos – PB encontrou 2,5% de prevalência para cães errantes, sendo este sorovar considerado acidental para cães (BATISTA et al., 2004), em Berlim, na Alemanha, foi encontrado 8% (SCHOLL et al., 2013) e em Kerala, na Índia, 6,1% (AMBILY et al., 2012).

Blazius et al. (2005) demonstraram que os cães se comportam como sentinelas, onde podem alertar quanto a introdução de um sorovar de importância

zoonótica e como indicador de contaminação ambiental. O resultado desta pesquisa revelou o surgimento de um sorovar não comum nos exames sorológicos para leptospirose canina.

Estudo realizado sobre a soroprevalência do sorovar *javanica* em ratos na Índia relataram a ocorrência de 50,3% de positividade (NATARAJASEENIVASAN et al. 2011). Vedhagiri et al. (2010) isolaram leptospirosas do roedor *Rattus norvegicus*, onde encontraram 14,3 % de positividade para o sorovar *javanica*. Paixão et al. (2011) ao pesquisarem leptospirose em animais silvestres de vida livre em Ilha Solteira – SP, encontraram em roedores (*Rattus* spp.) e teiús (*Tupinambis merianae*), 11,1% e 25%, respectivamente, de ocorrência para o sorovar *javanica*. Este sorovar também foi achado em equinos (2,7%) criados na Ilha do Algodal no Pará (MORAES et al., 2010) e em ovinos (19,5%) da região do meio norte do Mato Grosso (ECKSTEIN et al., 2014).

Os cães podem adquirir a doença através do contato com outros cães, com restos de alimentos contaminados, por ratos que podem urinar nos comedouros ou pelo contato direto com roedores infectados (LEMOS et al., 2010). Os roedores sinantrópicos, principalmente o *Rattus norvegicus* é principal reservatório urbano desta enfermidade, eles eliminam as bactérias através da urina por toda sua vida (JORGENS, 2011). Dados como esse são preocupantes, pois se observou que mais de 90% desses cães, apesar de domiciliados, dormem fora de casa.

Sabe-se que os ratos são conhecidos como fonte de inúmeros agentes patogênicos (HIMSWORTH et al., 2013). Apesar da não significância entre a presença de roedores e a sorologia, a cidade de Cruz das Almas possui uma porcentagem de 71,5% de roedores, o que pode indicar a possibilidade da alta prevalência deste sorovar nos bairros de estudo. Na qual se mostra uma mudança no padrão de ocorrência da doença, já que os sorovares encontrados com maior frequência em cães é o *icterohaemorrhagiae* e *canicola* (SANTIN et al., 2006) estes verificados em menor quantidade neste trabalho. Foi demonstrado também que 90,5% dos cães dormem do lado de fora da casa, ficando então expostos, tendo maiores possibilidades de contato com ratos, já que estes possuem comportamento noturno.

Somam-se a isto, observações realizadas no momento da coleta nos bairros em estudo, que revelaram terrenos baldios com presença de entulhos, lixos à revelia nas ruas, esgoto a céu aberto, acúmulo de materiais descartados no fundo das

casas, existência de cães errantes e outros animais domésticos, fatores que podem propiciar a disseminação da leptospirose no meio em que vivem os cães.

Outros sorovares encontrados foram: *castellonis*, *hardjo*, *sejroe*, *tarassovi*, *grippothyphosa*, *cynopteri*, *panama*, *pyrogenes*, *patoc*, *hebdomadis*, *copenhageni*, *pomona*, *autumnalis* e *wolffi*, o que mostra a existência de diversas variantes sorológicas na cidade de Cruz das Almas, o que sugere que os cães mantiveram contato, direto ou indireto, com fontes de infecção para a doença, possivelmente existente na região.

A maioria dos sorovares achados nesse trabalho não estão presentes nas vacinas comerciais para leptospirose. Isso fortalece a importância de pesquisas voltadas para o desenvolvimento de novas vacinas contra a leptospirose e a necessidade da inclusão de novos sorovares, visando à elaboração de uma proteção efetiva e de imunidade mais duradoura (BATISTA et al., 2005). De acordo com Castro et al. (2011), as bacterinas antileptospíricas para cães devem conter os principais sorovares que acometem essa espécie, numa dada região geográfica.

Os resultados dessa pesquisa revelavam que 67,5% dos responsáveis não levam seus cães ao médico veterinário, isso permite dizer que um cuidado básico e essencial, como vacinação, pode não está sendo realizado, já que 90% dos cães não são vacinados para leptospirose, este pode ser mais um aspecto que contribui para ocorrência da doença. Minke et al. (2009) ressaltaram a relevância de se vacinar os cães, pois promovem proteção contra a doença clínica.

Dos 60 cães positivos, 21 apresentaram coaglutinação. Títulos de coaglutinação também foram encontrados Aguiar et al. (2007) e Benitez et al. (2010). Segundo Castro et al. (2011), isto pode ser um forte indicativo de reações cruzadas entre os sorovares.

A idade foi à única variável que apresentou significância estatística quando comparada com a soropositividade, onde cães entre 6 meses e 5 anos apresentaram maiores chances de adquirir a doença. Um trabalho semelhante foi realizado por Silva et al. (2006) que encontraram maior número de cães reagentes com idade entre 1,1 a 5 anos, o que mostra uma exposição com elevada frequência e precocidade em relação ao contato com as leptospiras.

Ao incorporar cada uma das variáveis em estudo com a idade, encontrou-se significância estatística para presença de roedores, acesso a rua e o não uso de raticida. Langoni et al. (2013) em estudo realizado em Botucatu – SP, observaram

que a alta prevalência para o sorovar *grippotyphosa* esteve associação positiva para presença de ratos no domicílio. No presente estudo, a ocorrência de ratos encontrase influenciando a soropositividade em animais menores que cinco anos, assim, existe a possibilidade de maior exposição destes animais de forma direta ou indiretamente aos roedores. Os cães podem se contaminar ao ingerir ratos, estes ainda podem contaminar o solo, a água e alimentos com sua urina (FREIRE et al. 2007), sendo que a depender da temperatura e umidade, as bactérias podem permanecer por longos períodos no ambiente (HASHIMOTO et al., 2012).

Outra variável que apresentou significância foi o acesso à rua, estes animais ao saírem acompanhados de seus responsáveis ou por algum descuido tenham fugido de casa podem entrar em contato com cães errantes ou outras fontes de infecção. De acordo com Lemos et al. (2010), a presença de cães errantes contribui para disseminação da leptospira, sendo muitas vezes assintomáticos por vários meses, o que possibilita a propagação da bactéria através da urina sujeitando a população e outros animais a infecção. Deve-se levar em consideração o fato do comportamento sexual dos cães de lambar e cheirar a genitália e urina dos outros animais, o que possibilita mais uma forma de contato e infecção, isso foi constatado por Modolo et al. (2006) que acharam uma maior porcentagem de cães machos soropositivos, onde relacionaram a esse fato. Em um estudo realizado por Magalhães et al. (2007) demonstraram que cães ao ingerirem água empoçada, revirarem lixo com restos de alimentos contaminados com a urina de roedores tem 3,59 vezes risco de adquirirem esta doença.

Ademais, cães que possuem contato com outros animais possuem 23% de soropositividade demonstrado nesse trabalho, já que foi encontrado também equinos, ovinos e suínos andando livremente pelos locais de coleta. Pelo exposto, fica demonstrado que o acesso à rua gera uma série de possibilidades para que os cães se tornem infectados. A persistência de focos de leptospirose se deve a animais infectados, convalescentes e assintomáticos, que servem como fonte contínua de contaminação ambiental (OLIVEIRA et al., 2004).

Os responsáveis pelos animais que não tem costume de consultar a equipe de controle de roedores em seu domicílio, gera um favorecimento na soropositividade dos animais menores que 5 anos. O uso de raticida é uma medida química empregada para o controle de roedores (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009), o não uso de maneira adequada poderia estar implicando na permanência de um

ambiente com constante presença de roedores, o que estaria influenciando a soropositividade nesses cães.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho ajudaram a compreender melhor a prevalência da leptospirose canina na cidade de Cruz das Almas – BA, sendo possível observar uma maior frequência para um sorovar não comum para a espécie canina, o que desperta a necessidade de se reconsiderar os procedimentos de prevenção da leptospirose, principalmente no tocante a produção de vacinas.

As comparações entre os valores sorológicos positivos para leptospirose e os dados extraídos dos questionários aplicados, demonstraram significância em relação ao fator de risco idade entre seis meses e cinco anos. Este dado foi contrastado com as outras variáveis do estudo, onde houve significância para presença de roedores, acesso a rua e o não uso de raticida. Estes fatores contribuíram para que animais menores que cinco anos fossem soropositivos.

Os dados mostram que os roedores podem ser potenciais mantenedores das leptospirosas no ambiente e os cães se comportam como reservatório e sério fator de risco para os seres humanos, assim como são indicadores dos sorovares presentes na área. Diante disso, a necessidade da elaboração de programas de controle da doença com ações direcionadas para o uso de vacinas que contenham sorovares presentes na região, bem como saneamento do meio ambiente, visando, principalmente o controle de roedores e a educação em saúde. É importante ressaltar que todos os responsáveis foram comunicados sobre a soropositividade dos seus animais.

REFEÊNCIAS

- AMBILY, R. et al. Canine leptospirosis – a seroprevalence study from Kerala, India. *Vet World* 6(1):42-44, 2012.
- ACHA P.N.; SZYFRES B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animals: Clamidiosis, rickettsiosis y virosis., 2.ed. Washington: Organizacion Panamericana de La Salud, 2003. p. 580.
- ADLER, B.; MOCTEZUMA, A.P. *Leptospira* and Leptospirosis. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v.140, n.3/4, p.287-296, 2010.
- AGUIAR, D. M. et. al. Fatores de risco associados à ocorrência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em cães do município de Monte Negro, Rondônia, Amazônia Ocidental Brasileira. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 59, n. 1, p.70-76, 2007.
- ALVES, J. C.; ANDRADE J. S. L.; VASCONCELLOS, A. S.; MORAIS, Z. M.; AZEVEDO, S. S.; SANTOS, F. A. Avaliação dos níveis de aglutininas antileptospiras em cães no município de Patos – PB, Brasil. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, Niterói, v. 7, n. 1, p. 17-21, 2000.
- ANDRADE, S.F., *Manual de terapêutica veterinária*, 3º ed. São Paulo: Roca, 2008, p.936.
- ANDRADE, D. M. Expressão, purificação e caracterização das proteínas Lp29 e Lp49 de *Leptospira interrogans*. Monografia, São Paulo, 2010.
- ANDRÉ-FONTAINE, G. Canine leptospirosis – Do we have a problem. *Veterinary Microbiology*, v. 117, p. 19-24, 2006
- ANZAI, E.K. Utilização da PCR para o Diagnóstico da Leptospirose em Cães naturalmente infectados por *Leptospira* spp. Londrina: UEL, 2006. 48 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.
- AZEVEDO S. S., FERNANDES A. R. F., QUEIROGA I. M. B. N., MORAIS Z. M., SANTOS C. S. A. B. & VASCONCELLOS S. A. Ocorrência e fatores de risco associados a leptospirose em cães atendidos em hospital veterinário no semiárido paraibano. *Braz. J. Vet. Res. An. Sc.* 48: 161-166, 2011.
- BALBINOT et al. Perfil de Consumo de Substâncias Psicoativas por Adolescentes Escolares do Ensino Fundamental da Grande Porto Alegre/RS. *Interação Psicol.*, Curitiba, v. 16, n. 2, p. 211-216, 2012.
- BARBOSA, A. S. et al. Immune evasion of leptospira species by acquisition of human complement regulator C4BP. *Infect. Immun.*, v. 77, n. 3, p. 1137-1143, 2009.

BARBOSA, A. S. et al. Functional characterization of LcpA, a surface – exposed protein of *Leptospira* spp. that binds the human complement regulator C4BP. *Infect. Immun.*, v. 78, n. 7, p. 3207-3216, 2010.

BATISTA, C. S. A.; AZEVEDO, S. S.; ALVES, C. J.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z. M.; CLEMENTINO, I. J.; LIMA, F. S.; ARAUJO NETO, J. O. Soroprevalência de leptospirose em cães errantes da cidade de Patos, Estado da Paraíba, Brasil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo, v. 41, n. 2, p. 131-136, 2004.

BATISTA, C. S. A. et. al. Soroprevalência e fatores de risco para a leptospirose em cães de Campina Grande, Paraíba. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 57, p. 179-185, 2005.

BENITEZ, A. RODRIGUES, G.G.; GONÇALVES, D. D.; BURKE, J. C.; ALVES, L. A.; MÜLLER, E. E.; FREITAS, J. C. Leptospirose em cães errantes encontrados em campus universitário: avaliação sorológica e exame direto da urina. *Seminário: Ciências Agrárias*, v.31, n. 1, p. 191-196, 2010.

BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICALDI, J. N. *et al.* Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 3, n. 12, p. 757-771, 2003.

BLAZIUS R.D., ROMÃO P.R.T., BLAZIUS E.M.C.G. & SILVA O.S. Ocorrência de cães errantes soropositivos para *Leptospira* spp. na cidade de Itapema, Santa Catarina, Brasil. *Cad. Saúde Públ.* 21:1952-1956, 2005.

BIAZZOTI, R. Leptospirose Canina. Rio de Janeiro: UCB, 2006. 27 p. Monografia - Curso de Especialização "Lato Sensu" em Clínica Médica de Pequenos Animais, Universidade Castelo Branco, Rio de Janeiro, 2006.

BIESDORF, S. M. *et al.* Sorologia negativa e PCR positiva: a importância da biologia molecular para o diagnóstico de leptospirose aguda em um cão. *Revista Clínica Veterinária*. v. 13, n. 73, p. 44-48, 2008.

BLOM, A. M. Structural and functional studies of complement inhibitor C4b-binding protein. *Biochem. Soc. Trans.*, v. 30, pt. 6, p. 978-982, 2002.

BOOMKENS, S. Y. et al. PCR screening for candidate etiological agents of canine hepatitis. *Veterinary Microbiology*, v. 108, p. 49-55, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. 6º ed. Brasília: Ministério da Saúde. Serie A normas e manuais técnicos, p. 816. 2005.

BROD, C. S. et al. Evidência do Cão como Reservatório da Leptospirose Humana: Isolamento de um Sorovar, Caracterização Molecular e Utilização em Inquérito Sorológico. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Pelotas, v. 38, n. 4, p. 294-300. 2005.

BROWN P.D., GRAVEKAMP C., CARRINGTON D.G., VAN DE K.H., HARTSKEERL R.A., EDWARDS CN, EVERARD CO, TERPSTRA WJ, LEVETT PN. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. *J. Med. Microbiol.* 43:110-4, 1995.

BURR, P., LUNN, K., & YAM, P. Current perspectives on canine leptospirosis. In *Practice*, v. 31, p. 98-102, 2009.

CASTRO, J. R.; SALABERRY, S. R. S., SOUZA, M. A.; RIBEIRO, A. M. C. L. Sorovares de *Leptospira* spp. predominantes em exames sorológicos de caninos e humanos no município de Uberlândia, Estado de Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 44, n. 2, p. 217-222, 2010.

CAVALCANTI, M. P. et al. Avanços biotecnológicos para o diagnóstico das doenças infecciosas e parasitárias. *Revista de Patologia Tropical, Goiás*, v. 37, n. 1, p. 1-14, 2008.

CERQUEIRA, G. M.; PICARDEAL, M. A. A century of *Leptospira* strain typing. *Infect. Genet. Evol.*, v. 9, n. 5, p. 760-768, 2009.

CHOY, H. A.; KELLEY, M. M.; CHEN, T. L. *et al.* Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. *Infection and Immunity*, v. 75, n. 5, p. 2441-2450, 2007.

CHOY, H. A. et al. The multifunctional LigB adhesion binds homeostatic proteins with potential roles in cutaneous infection by pathogenic *Leptospira interrogans*. *PLoS One*, v. 6, n. 2, p. e 16879, 2011.

CINCO, M. New insights into the pathogenicity of leptospires: evasion of host defences. *The New Microbiologica*, v. 33, n. 4, p. 283-292, 2010.

CIPULLO, R. I.; DIAS, R. A. Associação de variáveis ambientais á ocorrência da leptospirose canina e humana na cidade de São Paulo. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, v. 64, n. 2, p. 363-370, 2012.

COUTINHO, M. L.; VASCONCELLOS, F. A.; FERNANDES, C. P. H.; SEYFFERT, N.; SEIXAS, F. K.; HAAKE, D. A.; KO A. I.; DELLAGOSTIN O. A.; ALEIXO, J. A. G. Evaluation of the anti-LipL32 monoclonal antibodies potential for use in leptospirosis immunodiagnostic tests. *Journal of Immunoassay & Immunochemistry*, v. 28, n. 3, p. 279 -288, 2007.

COIRO, C. J.; LANGONI, H.; DA SILVA, R. C.; ULLMANN, L. S. Fatores de risco para leptospirose, leishmaniose, neosporose e toxoplasmose em cães domiciliados e peridomiciliados em Botucatu –SP. *Veterinária e Zootecnia, Botucatu*, v. 18, n. 3, p. 393-407, 2011.

COSTA, E. R. A. et al. Alterações hematológicas, morfológicas sanguíneas e bioquímicas em um cão com leptospirose. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*. N, 21, 2013. ISSN: 1679-7353.

COWGILL, L. D.; ELLIOTT, D. A. Insuficiência renal aguda. In: ETTINGER, S. J., FELDEMAN, E. C (Ed). Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, p. 1701-1721.

CRODA, J., J. G. RAMOS, J. MATSUNAGA, A. QUEIROZ, A. HOMMA, L. W. RILEY, D. A. HAAKE, M. G. REIS, AND A. I. KO. *Leptospira* immunoglobulin-like proteins as a serodiagnostic marker for acute leptospirosis. J. Clin. Microbiol. 45:1528–1534, 2007.

CULLEN P.A., HAAKE D.A., BULACH D.M., ZUENER R.L., ADLER B. LipL21 is a novel surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. Infect Immun. 71 (5): 2414-21, 2003.

ECKSTEIN, C. et al. Características dos rebanhos ovinos da região meio-norte de Mato Grosso associadas à ocorrência de anticorpos anti- *Leptospira* spp. In: Congresso Nordestino de Produção Animal, 9, 2014. Bahia: UFRB. Anais...Bahia, p.1-4.

EMBRAPA. Centro de Pesquisa Mandioca e Fruticultura Tropical da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Cruz das Almas, 2010. Disponível em: <<http://www.cnpmf.embrapa.br/index.php?menu=1&p=aunidade.localizacao.php&men=1>>. Acesso em: 03 mar. 2016.

ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. Tratado de Medicina Interna Veterinária: Doenças do Cão e Gato. 5ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 1038 p.

FACCIOLI, P. Y. et al. Fatores de risco para leptospirose canina em bairro carente, jardim santa elisa, botucatu, são paulo, brasil. Vet. e Zootec. v.14, n.2, dez., p. 306-314, 2007.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. *Leptospira* and leptospirosis. 2 ed. Melbourne: Medical Science, 1999, 272p.

FERNANDES, C. P. H.; SEIXAS F. K.; COUTINHO, M. L.; VASCONCELLOS, F. A.; SEYFFERT, N.; CRODA, J.; McBRIDE, A. J.; KO, A. I.; DELLAGOSTIN, O. A.; ALEIXO, J. A. G. Monoclonal Antibodies Against LipL32, the Major Outer Membrane Protein of Pathogenic *Leptospira*: Production, Characterization, and Testing in Diagnostic Applications. Hybridoma, v. 26, n. 1, 2007.

FERNANDES, A. R. F, et. al. Soroepidemiologia da leptospirose canina na região metropolitana de Natal, estado do Rio Grande do Norte Rev.Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci, Sao Paulo, v. 50, n. 3, p. 226-232, 2013.

FIGHERA, R. A. et al. Causas de morte e razões para a eutanásia de cães da Mesorregião do Centro Ocidental Rio-Grandense (1965-2004). Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 28, n. 4, p. 223-230, 2008.

FILHO, G. V. A. Inquérito sorológico da leptospirose em cães da região metropolitana do Recife e da Ilha de Fernando de Noronha, PE- Recife, 2012. Dissertação de mestrado, PE- Recife, 2012.

FLANNERY B.; COSTA D., CARVALHO F.P.; GUERRIERO H., MATSUNAGA J., DA SILVA E.D., et al. Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol.* 39 (9): 3303-10, 2001.

FONSECA CDE, A et al. *Leptospira* DNA detection for the diagnosis of human leptospirosis. *J. Infect.*, v. 52, n.1, p. 15-22, 2006.

FRAGA, T. R., BARBOSA, A. S., & ISAAC, L. Leptospirosis: aspects of innate immunity, immunopathogenesis and immune evasion from the complement system. *Scand J Immunol* , 73, 408-19, 2011.

FREIRE, I. M. A. et al. Distribuição dos serovares de leptospira em caninos clinicamente suspeitos no Rio de Janeiro. *R. bras. Ci. Vet.*, v. 14, n. 2, p. 83-85, 2007.

GARCIA, M.; MARTINS, L. S. Zoonoses: leptospiroses. Disponível em <http://www.mgar.com.br/zoonoses/aulas/aula_leptospirose.htm> Acessado em mar. 2015.

GASCHEN, F. Canine leptospirosis. In: World Small Animal Veterinary Congress, 33, 2008, Dublin. Anais...Dublin: Louisiana State University, p.320-322.

GEISEN, V.; STENGEL, C.; BREM, S.; MULLER, W.; GREENE, C.; HARTMANN, K. Canine leptospirosis infections- clinical signs and outcome with different suspected *Leptospira* serogroups (42 cases). *Journal of Small Animal Practice*, Oxford, v.48, n.6, p 324-328, 2007.

GIRIO RJS, PEREIRA FLG, MARCHIORI Filho M, MATHIAS LA, HERREIRA, RCP, ALESSI AC, et al. Pesquisa de anticorpos contra *Leptospira* spp. em animais silvestres e em estado feral da região de Nhecolândia, Mato Grosso do Sul, Brasil: utilização da técnica de imuno-histoquímica para detecção do agente. *Ciênc Rural*; 34:165-9, 2004.

GOMES, M. J. P. Gênero *Leptospira* spp. FAVET-UFRGS, 2013.

GREENE, C. E. et al. Leptospirosis. In: GREENE, C. E. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Georgia: Saunders, 2006, p. 402-417.

GREENE, C. E. Doenças Bacterianas. In: ETTINGER, Stephen J.; FELDMAN, Edward C. *Tratado de Medicina Interna Veterinária. Doenças do cão e do gato*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 418-419.

GREENE, C. E.. Canine Leptospirosis, emerging or surging?. In: International Congress of the Italian Association of Companion Animal Veterinarians, 1, 2008, Rimini. Anais... Rimini, Itália, p.241-242.

GUIDI, R. C. Leptospirose em pequenos animais, Rio de Janeiro, UCB, 2006. p.54. Monografia, Universidade Castelo Branco, Rio de Janeiro, 2006.

HAAKE D.A., CHAO G., ZUERNER R.L., BARNETT J.K., BARNETT D., MAZEL M., MATSUNAGA J., LEVETT P.N., BOLIN C.A. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect. Immun.* 68:2276-85, 2000.

HAGIWARA, M. K. Leptospirose canina. Boletim Técnico. Pfizer Saúde Animal, p. 1-6, nov.2003.

HARKIN, K. R. Leptospirosis. In: J. Bonagura, & D. Twedt, Kirk's Current Veterinary Therapy XIV. Elsevier Saunders, 2008, p.1237-1240.

HASHIMOTO, V. Y. et al. Prevalência e fatores de risco associados à *Leptospira spp.* em rebanhos bovinos da região centro-sul do estado do Paraná. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 32, n. 2, p. 99-105, 2012.

HIRSH, D. C.; CHUNG, Z. Y. *Microbiologia Veterinária*. 1 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 446p.

HIMSWORTH CG, Parsons KL, Jardine C, Patrick DM. Rats, cities, people, and pathogens: a systematic review and narrative synthesis of literature regarding the epidemiology of rat-associated zoonoses in urban centers. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 13:349–59, 2013.

HOKE D.E., EGAN S., CULLEN P.A., ADLER B. LipL32 is an extracellular matrix-interacting protein of *Leptospira spp.* and *Pseudoalteromonas tunicata*. *Infect. Immun.* 76, 2063-2069, 2008.

IBGE, 2015. Censo Demográfico: Cidades – Cruz das Almas. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=290980>. Acesso em: 10 abril 2016.

JIMENEZ-COELHO, M.; VALDO-SOLIS, I.; CÁRDENAS-MARRUFO, M.; RODRÍGUEZ-BUENFIL, J.C.; ORTEGA-PACHECO, A. Serological survey of canine leptospirosis in the tropics of Yucatan Mexico using two different tests. *Acta Tropica*, Basel, v.106, n.1, p.22-26, 2008.

JORGE, R. S. P. et al. Exposição de livre-variando carnívoros selvagens, cavalos e cães domésticos para *Leptospira spp.* no norte do Pantanal, Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106: 441-444, 2011.

JORGENS, E. N.; SCHMITT, C. I. Leptospirose em cães: uma revisão bibliográfica. In: Seminário Interinstitucional de Cruz Ensino, Pesquisa e Extensão, 2011, Cruz Alta. Anais... Cruz Alta: UNICRUZ, p. 4.

JESUS, N. H. Meios Diagnósticos da Leptospirose Canina. Mossoró, UFERSA, 2009. 21 p. Monografia - Curso de Especialização em Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2009.

KIKUTI, M.; LANGONI, H.; NÓBREGA, D. B.; CORRÊA, A. P. F. L.; ULLMANN, L. S. Occurrence and risk factors associated with canine leptospirosis. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, Botucatu, v. 18, n. 1, p. 124-127, 2012.

KO, A. I., C. Goarant, and M. Picardeau. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol* 7:736-747, 2009.

LANÇA, S.I.O Contribuição para o estudo da Leptospirose canina em Portugal. Lisboa, ULHT, 2011. 124p. Dissertação de mestrado. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2011.

LANGONI H. et al. Variáveis epidemiológicas e alterações clínicas, hematológicas e urinárias em cães sororreagentes para *Leptospira* spp. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 34, n. 2, p. 765-776, 2013.

LAPPIN, M. R.. Doenças Bacterianas Polissistêmicas. In: COUTO, C. Guilherme; NELSON, Richard W. *Medicina Interna de Pequenos Animais*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. p. 1222-1224.

LEFEBVRE, R. B. Leptospiras. In: HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. *Microbiologia Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003, p. 174-177.

LEMOS, J. P.; MELO, C. B.; VIEGAS, S. A. R. A. Análise sorológica de *Leptospira* spp. em cães errantes no município de Aracaju. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*. n. 14, 2010.

LÉON, A. et al. Identification of pathogenic *Leptospira* strains in tissues of a premature foal by use of polymerase chain reaction analysis. *J. Vet. Diagn. Invest.* n. 18, p. 218-221, 2006.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 14, n.2, p. 296-326, 2001.

LEVETT, P. N. Leptospirosis: a forgotten zoonosis? *Clinical and Applied Immunology Reviews*, v. 4, n. 1, p. 435-448, 2004.

LEVETT, P. N; HAAKE, D. A. *Leptospira* Species (Leptospirosis). In: Gerald L. Mandell, John E. Bennett, Raphael Dolin (Ed.). *Principles and practice of infectious diseases*. Philadelphia: Elsevier, 2009, p.1-7.

LO, M., CORDWELL, S. J., BULACH, D. M. and ADLER, B. Comparative transcriptional and translational analysis of leptospiral outer membrane protein expression in response to temperature. *PLoS Negl Trop Dis*, 3, e560. 2009.

LOMAR, A. V.; VERONESI, R.; BRITO, T.; DIAMENT, D. Leptospiroses. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. *Tratado de infectologia*. São Paulo: Atheneu, 2002, p. 987-1003.

LIN Y. P. et al. Leptospira immunoglobulinlike protein B (LigB) binding to the C-terminal fibrinogen alphaC domain inhibits fibrin clot formation, platelet adhesion and aggregation. *Mol. Microbiol.*, v. 79, n. 4, p. 1063-1076, 2011.

LÜDTKE, C. B.; COUTINHO, M. L.; JOUGLARD, S. D. D.; MOREIRA, C. N.; FERNANDES, C. P. H.; BROD, C. S.; HAAKE, D. A.; KO, A. I.; DELLAGOSTIN, O. A.; ALEIXO, J. A. G. Monoclonal antibodies against an outer membrane protein from pathogenic *Leptospira*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 34, p. 1-4, 2003.

MAGALHAES, D. F.; SILVA, J. A.; MOREIRA, E. C.; WILKE, V. L. M.; HADDAD, J. P. A.; MENESES, J. N. C. Prevalencia de aglutininas anti-*Leptospira interrogans* em caes Belo Horizonte, Minas Gerias, 2001 a 2002. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v. 58, n. 2, p. 167-174, 2006.

MAGALHÃES, D. F. Perfil dos cães sororreagentes para aglutininas anti-*Leptospira interrogans* em Belo Horizonte, Minas Gerais, 2001/2002. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.59, n.5, p.1326-1329, 2007.

MAGALHÃES, D.F.; SILVA, J.A.; MOREIRA, E.C.; WILKE, V.M.L.; HADDAD, J.P.A.; MENESES, J.N.C. Prevalência de aglutininas anti-*Leptospira interrogans* em cães de Belo Horizonte, Minas Gerais, 2001 a 2002. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia, PUBVET, Londrina, V. 4, N. 31, Ed. 136, Art. 919, 2010.*

MALMSTROM, J. et al. Proteome-wide cellular protein concentrations of the human pathogen *Leptospira interrogans*. *Nature*, v. 460, n. 7256, p. 762-765, 2009.

MARTINS, C. M. et al. Incidence of canine leptospirosis in the metropolitan area of Curitiba, State of Parana, Southern Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 46, n.6, p. 772-775, 2013.

MATSUNAGA, J., BAROCCHI, M.A., CRODA, J., YOUNG, T.A., SANCHEZ, Y., SIQUEIRA, I., BOLIN, C.A., REIS, M.G., RILEY, L.W., HAAKE, D.A. and KO, A.I. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. *Mol Microbiol*, 49(4), 929-945. 2003.

MATSUNAGA, J.; SANCHEZ, Y.; XU, X. *et al.* Osmolarity, a key environmental signal controlling expression of leptospiral proteins LigA and LigB and the extracellular release of LigA. *Infection and Immunity*, v.73, n.1, p. 70-78, 2005.

MCBRIDE, A. J. A. et al. Leptospirosis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v. 18, p. 376-386, 2005.

MCDONOUGH, P. L.. Leptospirese. In: TILLEY, L.P.; SMITH, Francis W.K. *Consulta Veterinária em 5 minutos- canina e felina*. São Paulo: Manole, 2008. p. 1560.

MELLO, L.P.P.; MANHOSO, F.F.R. Aspectos epidemiológicos da leptospirese canina no Brasil. *Unimar Ciências, Marília*, v.16, n.1-2, p.27-32, 2007.

MERI T., et al. Regulation of complemente activation at the C3-level by sérum resistant leptospirese. *Microb Pathog* 39: 139-147, 2005.

MERIEN, F.; BARANTON, G.; PEROLAT, P. Invasion of Vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic *Leptospira interrogans* are correlated with virulence. *Inf. Immun.* v. 65, n. 2, p. 729–738, 1997.

MILLER, R. L. et al. Clinical and epidemiological features of canine leptospirosis in North Queensland. *Australian Veterinary Journal*, v. 85, n.1-2, p.13-19, 2007.

Minke J.M., Bey R., Tronel J.P., Latour S., Colombert G., Yvorel J., Cariou C., Guiot A.L., Cozette V. & Guigal P.M. Onset and duration of protection immunity against clinical disease and renal carriage in dogs provided bi-valent inactivated *Leptospira* vaccine. *Vet. Microbiol.* 137:137-145, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde - Departamento de Vigilância Epidemiológica, 7 ed. Série A. Normas e Manuais Técnicos: Brasília – DF, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças parasitárias: guia de bolso. 8. ed. rev. Brasília. 2010.

MODOLO J. R. et al. Investigação soropidemiológica de leptospirose canina na área territorial urbana de Botucatu, São Paulo, Brasil. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, São Paulo, v. 43, n. 5, p. 598-604, 2006.

MONTENEGRO, G. E. S. et al. RELATO DE CASO: Características clínicas, hematológicas e anatomopatológicas em um cão com leptospirose. In: JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 10, Recife. Anais...Recife: UFRPE, p.1-4.

MORAES, C. C. G. et al. Pesquisa de anticorpos para sorovares de *Leptospira interrogans* patogênicas em equídeos criados na ilha de Algodão, Estado do Pará. *Rev. Ci. Agra.*, v.53, n.2, p.188-194, 2010.

MUSSO, D.; LA SCOLA, B. Laboratory diagnosis of leptospirosis: a challenge. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, v. 46, n. 4, p. 245-252, 2013.

NASCIMENTO, A.L.T.O.; VERJOVSKU-ALMEIDA, S.; VAN SLUYS, M.A.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; CAMARGO, L.E.A.; DIGIAMPIETRI, L.A.; HARSTKEERI, R.A.; HO, P.L.; MARQUES, M.V.; OLIVEIRA, M.C.; SETUBAL, J.C.; HAAKE, D.A.; MARTINS, E.A.L. Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 37, n4, p. 459-477, 2004a.

NATARAJASEENIVASAN, K. et al. Seroprevalence of *leptospira borgpetersenii* serovar javanica infection among dairy cattle, rats and humans in the cauvery river valley of southern india. Vol 42 No. 3, 2011.

NEGRÃO, D.D.; GONÇALVES, D. Incidência de leptospirose em cães errantes acolhidos no centro de controle e zoonoses de Curitiba. *Revista Eletrônica da Faculdade Evangélica do Paraná*, Curitiba, v.2, n.4, p.63-68, 2012.

- NELSON, R. W.; COUTO, C. G. Doenças bacterianas polissistêmicas. In: NELSON, R. W.; COUTO, C. G. (Ed.) Medicina interna de pequenos animais. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, p. 1221-1226.
- NEWMAN, S. J.; CONFER, A. W.; PANCIERA, R. J. Sistema urinário. In: MACGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. (Eds.). Bases da Patologia Veterinária. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009, p. 613-691.
- OIE. World Organisation for Animal Health. Leptospirosis, 2014. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.01.09_LEPTO.pdf. Acesso em: 26 mai. 2016.
- OKUDA, M.; SAKAI, Y.; MATSUUCHI, M.; OIKAWA, T.; WATANABE, M.; ITAMOTO, K.; IWATA, H.; KANO, R.; HASEGAWA, A.; ONISHI, T.; INOKUMA, H.. Enzymelinked immunosorbent assay for the detection of canine leptospira antibodies using recombinant OmpL1 protein. Journal of Veterinary Medical Science, v. 67, n. 3, p. 249-254, 2005.
- OLIVEIRA S.J., Pires Neto JAS. Aspectos etiológicos e de diagnóstico nas leptospiroses. Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária, 10:36-46, 2004.
- OLIVEIRA, S.T. Leptospirose Canina: dados clínicos, laboratoriais, e terapêuticos em cães naturalmente infectados. Porto Alegre: UFRGS, 2010. 89 p. Tese - Doutor em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.
- OLIVEIRA R. et al. Ahesins of *Leptospira interrogans* mediate the interaction to fibrinogen and inhibit fibrina clot formation in vitro. PLoS Negl. Trop. Dis., v. 7, n. 8, p. e2396, 2013.
- PAIXÃO *et. al.* Soroprevalência para leptospirose em animais silvestres de vida livre procedentes do centro de conservação da fauna silvestre de Ilha Solteira, SP. *Biológico*, São Paulo, v.73, n.2, p.20-213, jul./dez., 2011.
- PALANIAPPAN, R. U. M.; CHANG, Y.F.; JUSUF, S. S. D. *et al.* Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA protein of *Leptospira interrogans*. Infection and Immunity, v. 70, n. 11, p. 5924-5930, 2002.
- PAULA, E. V. Leptospirose Humana: uma Análise Climato-Geográfica de sua Manifestação no Brasil, Paraná e Curitiba. In: Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, 12, Goiânia. Anais...Goiânia, p. 2301-2308.
- PICARDEAU, M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. Med. Mal. Infect., v. 43, n. 1, p. 1-9, 2013.
- PICARDEAU, M. et al. Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: current tools and emerging technologies. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., v. 78, n. 1, p.1-8, 2014.

PINNA, M. H. et al. Leptospirose em cães. PUBVET, Londrina, V. 4, N. 32, p.1-24, 2010.

PINNE, M.; CHOY, H. A.; HAAKE, D. A. The OmpL37 surface-exposed protein is expressed by pathogenic *Leptospira* during infection and binds skin and vascular elastin. PLoS Negl. Trop. Dis., v.4, n. 9, p. e815, 2010.

QUINN, P. J.; MARKEY, B.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. Microbiologia veterinária e doenças infecciosas. Porto Alegre: Artmed, 2005, 512p.

REICHMANN, M.L.A.B.; PINTO, H.B.F.; NUNES, V.F.P. *Vacinação contra a raiva de cães e gatos*. São Paulo: Instituto Pasteur, 1999. 32p.

RIVERA, J. et al. Fibrinogen-binding proteins of gram-positive bacteria. Thromb Haemost, v. 98, n. 3, p. 503-511, 2007.

RODRIGUES, A. M. A. Leptospirose canina: diagnóstico etiológico, sorológico e molecular e avaliação da proteção cruzada entre os sorovares icterohaemorrhagiae e copenhageni. São Paulo, USP, 2008, p.117. Tese de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

ROJAS, R. A. Algumas zoonosis. In: ROJAS, R.A. Epidemiologia. Buenos Aires: Intermédica, 2002, p. 127-131.

SANTIN, K., SELLA, A. B., NADVORNY, A., WOLFFENBÜTTEL, S., CARDOSO, M. R., I., SCHMIDT, V. Pesquisa de aglutininas anti- *Leptospira* em cães clinicamente saudáveis e em cães com suspeita clínica de leptospirose. Clín Vet., n. 60, p. 48-52, 2006.

SANTOS, A. C. Diagnóstico sorológico da leptospirose: benefício de amostra aguda tardia na confirmação de casos. Salvador, Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz. 2011. 94 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Medicina Investigativa) - Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2011.

SCHWEIGHAUSER, A. et al. Small intestinal intussusception in five dogs with acute renal failure and suspected leptospirosis (*L. australis*). Journal of Veterinary Emergency and Critical Care, v. 19, n.4, p. 363-368, 2009.

SCHOLL, A. M. et al. Distribution of *Leptospira* Serogroups in Dogs from Berlin, Germany. Vector-borne and zoonotic diseases. V13, N 3, 2013.

SEYFFERT, N. Anticorpos monoclonais contra as proteínas LigA e LigB de leptospirosas patogênicas: produção e caracterização, Brasil. Pelotas, UFPe, 2007. p.53. Dissertação de Mestrado em Ciências - Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2007.

SHERDING, R. G.. Infecções Bacterianas Sistêmicas. In: BIRCHARD, Stephen J.; SHERDING, Robert G (Ed.). Manual Saunders. Clínica de Pequenos Animais. São Paulo: Roca, 2008. p. 195-199.

- SILVA, W.B. et al. Avaliação de fatores de risco de cães sororeagentes à *Leptospira* spp. e sua distribuição espacial em área territorial urbana. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, São Paulo, v. 43, n. 6, p. 783-792, 2006.
- SILVA, W.B. et al. Inquérito sorológico e distribuição espacial da leptospirose canina em área territorial urbana da cidade de Botucatu, São Paulo. Vet. e Zootec., p. 656-668, v. 16, n. 4, 2009.
- SIQUEIRA G. H. Envolvimento de proteínas de membrana de *Leptospira interrogans* nos mecanismos de evasão e invasão do hospedeiro. São Paulo, USP, 2014, p.264. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.
- SOEK, K. Leptospirose canina – revisão. Curitiba, UTP, 2012, p.58. Monografia, Universidade Tuiuti do Paraná, Paraná, 2012.
- SOUZA, L. A.; VIANA, R. C. A.; MICHALICK, M. S. M.; REIS, J. K. P.; LAGE, A. P. Prevalência da infecção por *Brucella canis* em Belo Horizonte – MG. Revista Brasileira de Medicina Veterinária, v. 24, n. 3, p. 127-131, 2002.
- SOUZA, M. A. et al. Prevalência de leptospirose em cães no município de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. In: 4ª Semana do Servidor e 5ª Semana Acadêmica, 4, 2008. Uberlândia – MG. Anais... Uberlândia – MG.
- STEWART *et al.* Characterization of the Bat proteins in the oxidative stress response of *Leptospira biflexa*. BMC Microbiology, Bio Med Central, 12 (1), pp.290, 2012.
- SOTKES, J. E.; DRU FORRESTER, S. New and unusual causes of acute renal failure in dogs and cats. The Veterinary Clinics Small Animal Practice, v. 34, p. 909-922, 2004.
- SYKES, J. E.; HARTMANN, K. F. L.; MOORE, G. E.; STODDARD, R. A.; GOLDSTEIN, R. E. ACVIM Small animal consensus statement on leptospirosis: diagnosis, epidemiology, treatment and prevention. Journal of Veterinary Internal Medicine, United Kingdom, v. 25, n. 1, p. 1-13, 2011.
- TEIXEIRA, M.A.; GONÇALVES, M.L.L.; RIEDIGER, I.N.; PROSSER, C.S; SILVA, S.F.C.; BIESDORF, S.M.; MOSKO, P.R.E.; MORAIS, H.A.; BIONDO, A.W. Sorologia negativa e PCR positiva: a importância da biologia molecular para o diagnóstico de leptospirose aguda em um cão. Clínica Veterinária, São Paulo, v.8, n.73, p. 44-48. 2008.
- TESSEROLLI, G.L., ALBERTI, J.V.A., BERGAMASCHI, C., FAYZANO, L.; AGOTTANI, J. V.B. Principais sorovares de leptospirose canina em Curitiba, Paraná. PUBVET, V.2, N.2, 2008.
- TRIOLA, Mário F. Introdução à Estatística. 7a. Ed. Rio de Janeiro: LTC, 1999, p.707.
- VAN DE MAELE, I. et al. Leptospirosis in dogs: a review with emphasis on clinical aspects. The Veterinary Record, v. 163, p. 409-413, 2008.

VAN DEN INGHT, T. S. G. A. M. et al. Morphological classification of parenchymal disorders of the canine and feline liver. In: ROTHUIZEN, J., et al. (Eds.). WSAVA Standards for Clinical and Histological Diagnosis of Canine and Feline Liver Disease. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2006, p. 85-101.

VASCONCELLOS, S.A. Leptospirose canina no Brasil. Uma abordagem epidemiológica. Boletim técnico. Divisão de Saúde Animal, cód. 290.778, p.1-8, 2005.

Vedhagiri, K. CHARACTERIZATION OF *LEPTOSPIRA BORGPIETERSENII* ISOLATES FROM FIELD RATS (*RATTUS NORVEGICUS*) BY 16S RRNA AND *LIPL32* GENE SEQUENCING. Brazilian Journal of Microbiology, 41: 150-157, 2010

VERMA, A. et al. LfhA a novel factor H-binding protein of *Leptospira interrogans*. Infect Immun., v. 74, n.5, p. 2659-2666, 2006.

VIEIRA, M. C. Análise da expressão de proteínas de *Leptospira interrogans* virulentas e avirulentas pela proteômica. São Paulo, USP, 2008, p.131. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

VIEGAS, S.S.; TAVARES, C.H.T.; OLIVEIRA, E.M.; DIAS, A.R.; MENDONÇA, F.F.; SANTOS, M.F.O. Investigação sorológica para leptospirose em cães erantes na cidade de Salvador – Bahia. Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal, Salvador, v.2, p.21-30, 2001.

VIJAYACHARI, P.; SUGUNAN, A. P.; SHRIRAM, A. N. Leptospirosis: an emerging global public health problem. Journal of Biosciences, v. 33, n. 4, p. 557-569, 2008.

VISITH, S.; KEARKIAT, P. Nephropaty in leptospirosis. Journal of Postgraduate Medicine, v. 51, p.184-188, 2005.

WASINSKI, B.; DUTKIEWICZ, J. Leptospirosis—current risk factors connected with human activity and the environment. Ann. Agric. Environ. Med., v. 20, n. 2, p. 239 – 244, 2013.

WHO. Human Leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control. World Health Organization, 2003, 109p.

ANEXO 1



Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA

AUTORIZAÇÃO PARA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS

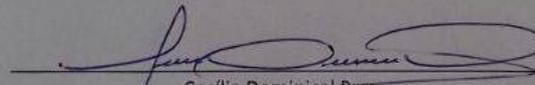
A COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, em reunião ocorrida no dia 11/05/2016, avaliou o projeto intitulado "INVESTIGAÇÃO DA LEPTOSPIROSE CANINA EM CRUZ DAS ALMAS-BA", registrado com o número de processo nº 23007.004595/2016-83, sob a responsabilidade de Robson Bahia Cerqueira, e **APROVOU** os procedimentos descritos. O projeto encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas e publicadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

Dados do projeto:

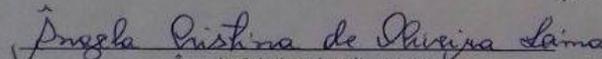
FINALIDADE	() Ensino (X) Pesquisa Científica
VIGÊNCIA DA AUTORIZAÇÃO	25/04/2016 a 31/07/2016
ESPÉCIE/LINHAGEM/RAÇA	Cães SRD
Nº DE ANIMAIS	200
PESO / IDADE	4 a 40Kg/ 3 meses a 12 anos
SEXO	Ambos os sexos
ORIGEM	Cães da cidade de Cruz das Almas

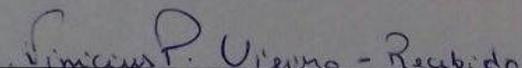
De acordo com a Resolução Normativa N°1 de 09 de julho de 2010, no capítulo II, Artigo 6°, do CONCEA, solicitamos que no final do projeto, seja entregue a CEUA uma cópia do relatório final.

Cruz das Almas, 24 de maio de 2016.


 Cecília Dominical Poy
 Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

Cecília Dominical Poy
 Coordenadora da
 Comissão de Ética no Uso de Animais
 Universidade Federal do Recôncavo da Bahia


 Ângela Cristina de Oliveira Lima
 Vice-coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais


 Vinícius P. Vieira - Recebido 04.07.16

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB

Campus Universitário, 710, Cruz das Almas – BA – CEP: 44.380-000

Fone: (75) 3621-6850 E-mail: ceua@ufrb.edu.br Home Page: <http://www.ufrb.edu.br>

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
 Comissão de Ética no Uso de Animais
 Rua Ruy Barbosa, 710, Cruz das Almas – BA
 CEP: 44.380-000

ANEXO 2

TERMO DE ESCLARECIMENTO E CONSENTIMENTO

TERMO DE ESCLARECIMENTO:

O senhor (a) está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa “**Investigação da Leptospirose Canina na cidade de Cruz das Almas – Bahia**”, sob responsabilidade dos professores Robson Bahia Cerqueira, Veridiana Fernandes da Silveira e Flávia Santin do curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB. O objetivo do presente trabalho é investigar a ocorrência da Leptospirose nos bairros Inocoop, Tabela, Areal e Estrada de ferro, situados na cidade de Cruz das Almas, Bahia. Sua participação é de caráter voluntário não obrigatório, e contribuirá de forma significativa no registro dos casos da doença em questão e na adoção de medidas de controle e prevenção na área da saúde humana e animal. É garantida a confidencialidade das informações geradas e a sua privacidade sobre as respostas da pesquisa.

TERMO DE CONSENTIMENTO:

Esclarecido sobre o objetivo da pesquisa que foi anteriormente exposto, eu _____, estou de acordo em participar deste trabalho, autorizando assim o uso dos resultados do mesmo para publicações científicas a respeito do tema, assinando este consentimento em duas vias, ficando com a posse de uma delas.

Cruz das Almas _____, de _____ de 20____

Assinatura

ANEXO 3

Inquérito Epidemiológico

DATA DE COLETA: ___/___/___ Nº AMOSTRA:

1. IDENTIFICAÇÃO:

Responsável: _____

Endereço: _____ Telefone: _____

Nome do animal: _____

2. INFORMAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA:

IDADE: () 6 meses a 5 anos () maior que 5 anos

RAÇA: () sem raça definida () raça definida

SEXO: () M () F

PROCEDÊNCIA: () adoção () comprado

PRESENÇA DE RATOS: () sim () não

NA SUA CASA EXISTE TRATAMENTO DE ESGOTO? () sim () não

DESTINO DO LIXO: () coleta da prefeitura () depósito em local aberto

O CACHORRO TEM ACESSO A RUA? () sim () não

O CACHORRO É VACINADO PARA LEPTOSPIROSE? () sim () não

O CACHORRO VAI AO VETERINÁRIO? () sim () não

O CÃO DORME ONDE A NOITE? () dentro de casa () fora de casa

QUANTO A ALIMENTAÇÃO: () fica a vontade () obedece horários

O CÃO TEM CONTATO COM OUTROS ANIMAIS? () sim () não

TEM HÁBITO DE CAÇAR? () sim () não

QUAIS ÁREAS FREQUENTADAS PELO CÃO? () zona urbana () zona rural

TIPO DE ALIMENTO FORNECIDO: () ração () outros

O ANIMAL TEM COSTUME DE MEXER NO LIXO? () sim () não

O ANIMAL É VERMIFUGADO? () sim () não

VOCÊ SABE O QUE É LEPTOSPIROSE? () sim () não

QUAL ORIGEM DA ÁGUA QUE O ANIMAL BEBE? () bebedouro () outros

FAZ UTILIZAÇÃO DE ALGUM RATICIDA? () sim () não

QUANTO A PRESENÇA DE GATO? () sim () não