

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA – UFRB
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
GRUPO DE PESQUISA INFECTOLOGIA E SAÚDE VETERINÁRIA –
GPISV

SÂNORA CAROLINE DE JESUS ROCHA

**CORRELAÇÃO ENTRE SINAIS CLÍNICOS E SOROPOSITIVIDADE
PARA LEPTOSPIROSE EM CÃES DOMICILIADOS NO MUNICÍPIO DE
CRUZ DAS ALMAS, BAHIA, BRASIL**

CRUZ AS ALMAS – BAHIA
JULHO – 2016

SÂNORA CAROLINE DE JESUS ROCHA

**CORRELAÇÃO ENTRE SINAIS CLÍNICOS E SOROPOSITIVIDADE
PARA LEPTOSPIROSE EM CÃES DOMICILIADOS NO MUNICÍPIO DE
CRUZ DAS ALMAS, BAHIA, BRASIL**

Trabalho de conclusão de curso 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 – BAHIA
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

SÂNORA CAROLINE DE JESUS ROCHA

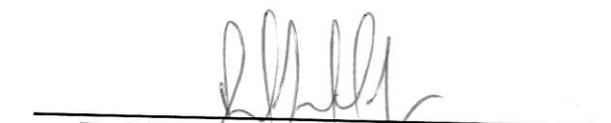
CORRELAÇÃO ENTRE SINAIS CLÍNICOS E SOROPOSITIVIDADE PARA
LEPTOSPIROSE EM CÃES DOMICILIADOS NO MUNICÍPIO DE CRUZ DAS ALMAS,
BAHIA, BRASIL



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



MSc. Ana Rosa dos Santos Otero
Universidade Federal da Bahia



Prof. DSc. Ricardo Mendes da Silva
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Cruz das Almas, 05de agosto de 2016.

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

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter colocado o sonho de ser Médica Veterinária em meu coração, por me conceder perseverança, força, sabedoria e paciência, para conseguir concretizar este sonho.

Aos meu pais, Edvaldo e Joanice pelo cuidado, amor, confiança e por lutar sempre na tentativa de me oferecer o melhor. A minha irmã Sanara, pelo companheirismo, incentivo e por sempre estar disposta a me escutar quando precisava desabafar.

Aos meus familiares, Júnior (cunhado), tios, tias e primos que de forma direta ou indireta me ajudaram a chegar até aqui.

A Diana Azevedo, que me ajudou em todo o desenvolvimento deste projeto e aos colegas Delcivan, Gabriel, Pedro e Vínicius que também participaram da execução desse estudo.

Ao meu orientador Robson Bahia, pelos ensinamentos e paciência e por ter aceito me orientar neste trabalho tão importante.

Aos mestres, responsáveis por passar grande parte dos conhecimentos adquiridos. Aos supervisores dos estágios realizados que com toda dedicação me ensinaram muito sobre o que é ser um profissional de verdade, sendo fundamentais em minha formação.

A funcionária do Hospital veterinário da UFRB Ana Paula, pelo auxílio na realização dessa pesquisa e por sempre estar disposta a ajudar.

Aos membros participantes da banca examinadora desse trabalho de conclusão de curso.

Obrigada!!

EPÍGRAFE

Instruir-te-ei e ensinar-te-ei o caminho que deves seguir; guiar-te-ei com meus olhos". Salmos 32:8.

RESUMO

A leptospirose é uma doença que pode se manifestar de forma aguda e sistêmica, que acomete o homem, animais domésticos e silvestres, distribuída mundialmente, a qual seu agente etiológico é a *Leptospira interrogans*. O objetivo desse trabalho foi realizar investigação da ocorrência da leptospirose canina utilizando amostras coletadas em quatro bairros do município de Cruz das Almas – Bahia, avaliando aspectos clínicos e sorológicos. O diagnóstico da leptospirose foi feito através da técnica de Soroaglutinação Microscópica, utilizando 19 sorovares. A frequência de animais sororreagentes encontrada foi de 30% (60/200), sendo o sorovar *Javanica* o mais frequente, apresentando 15,4% (6/39) entre as amostras positivas. Estatisticamente, os sinais clínicos que apresentaram correlação com os animais positivos foram a frequência cardíaca ($p = 0,002$; OR = 9,68), icterícia ($p = 0,032$; OR = 4,68), hematuria ($P = 0,004$; OR = 12,32) e apatia ($p = 0,046$; OR = 4,95). Conclui-se que os animais soropositivos para leptospirose podem apresentar diferentes sinais clínicos, sendo que a frequência cardíaca foi o que mais se destacou nesse experimento.

Palavra-chaves: população canina, Soroaglutinação microscópica, zoonose.

ABSTRACT

Leptospirosis is a disease that can an acute and systemic manifestation affecting humans, domestic and wild animals, worldwide distribution illness which the etiologic agent is the *Leptospira interrogans*. The aim of this study was to investigate the occurrence of canine leptospirosis using collected samples from four neighborhoods in the city of Cruz das Almas - Bahia, evaluating clinical and serological aspects. The diagnosis of leptospirosis was obtained by the Microscopic agglutination test technique, using 19 serovars. The frequency of seropositive animals found was 30% (60/200), being the Javanica sorovar the most commonly found, occurring in 15.4% (6/39) of the positive samples. Statistically, clinical signs correlated to the positive animals were the heart rate ($p = 0.002$; OR = 9.68), jaundice ($p = 0.032$; OR = 4.68), haematuria ($P = 0.004$; OR = 12, 32) and apathy ($p = 0.046$; OR = 4.95). It is concluded that seropositive animals for leptospirosis may present different clinical signs, and the heart rate was the most significant factor in this experiment.

Keyword: canine population ,microscopic agglutination test, zoonosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Microscopia eletrônica de <i>L. biflexa</i> , sorovar <i>Andamana</i> , cepa JNS.....	18
Figura 2 - Composição da parede celular das <i>Leptospiras spp</i>	21
Figura 3 - Icterícia significativa distribuída em órgãos e tecidos de um cão acometido pela leptospirose.....	26
Figura 4 - Localização do município de Cruz das Almas, Bahia.....	32
Figura 5 - Venopunção da veia cefálica acessória em cão de médio porte.....	33
Figura 6 - Aliquotagem das amostras.....	34
Figura 7 - Avaliação do aspecto clínico dos animais.....	35
Figura 8 - Preparação das amostras de soro e cepas para titulação.....	38
Figura 9 - Lâmina de vidro com marcações confeccionadas para facilitar a leitura microscópica.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de sorovares de <i>Leptospiras spp.</i> e seus hospedeiros de manutenção.....	23
Tabela 2 - Antimicrobianos comercializados que podem ser utilizados para o tratamento da leptospirose em cães.....	30
Tabela 3 - Relação de sorovares utilizados na Soroaglutinação Microscópica.....	37
Tabela 4 - Frequência da positividade de amostras sorológicas de cães da cidade de Cruz das Almas, Bahia, ao teste SAM, segundo o sorovar reagente e o título obtido.....	42
Tabela 5 - Coaglutinação de variados sorovares de <i>Leptospira spp.</i> encontrados em cães domiciliados no município de Cruz das Almas, Bahia.....	43
Tabela 6 - Correlação entre sorologia positiva, sinais clínicos e constantes fisiológicas.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

®	- Registrado
ALT	- Alanina Aminotransferase
BA	- Bahia
BID	- Duas vezes ao dia
ELISA	- Ensaio de adsorção imuno-enzimatico
EMJH	- Meio Ellinghausen McCullough Jonhson Harris
FA	- Fosfatase Alcalina
FC	- Frequência Cardíaca
IC	- Intervalo de Confiança
IgG	- Imunoglobulina G
IgM	- Imunoglobulina M
IL	- Interleucina
IM	- Intramuscular
IV	- Intravenoso
Kg	- Quilograma
LDI	- Laboratório de Doenças Infecciosas
LPS	- Lipopolissacarideo
MAT	- Teste de Aglutinação Microscópica
Mg	- Miligramas
MG	- Minas Gerais
mL	- Mililitros
mm ³	- milímetro cubico
NaCl	- Cloreto de sódio
Omp	- Proteína de membrana externa
OMS	- Organização Mundial de Saúde
OR	- <i>Odds ratio</i>
pH	- Potencial hidroneniônico
QUID	- Quatro vezes ao dia
Rpm	- Rotação por minuto
RS	- Rio Grande do Sul
SAM	- Soroaglutinação Microscópica
SC	- Subcutâneo

SID - Uma vez ao dia
SP - São Paulo
TID - Três vezes ao dia
TNF- α - Fator de necrose tumoral- α
TPC - Tempo de preenchimento capilar
UFRB - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
VO - Via oral
 μ L - microlitro
 μ m - Micrômetro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	17
2.1. OBJETIVO GERAL	17
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1. ETIOLOGIA	18
3.2. CARACTERÍSTICAS DE CULTIVO E CRESCIMENTO	19
3.3. CARACTERÍSTICAS ANTIGÊNICAS	20
3.4. TRANSMISSÃO	21
3.5. EPIDEMIOLOGIA	22
3.6. RESPOSTA IMUNE	24
3.7. PATOGENIA	25
3.8. SINAIS CLÍNICOS	25
3.9. DIAGNÓSTICO	27
3.9.1. DIAGNÓSTICO CLÍNICO	27
3.9.2. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	27
3.10. TRATAMENTO	28
3.11. VACINAS	30
3.12. CONTROLE E PREVENÇÃO	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1. LOCAL DE ESTUDO	32
4.2. COLETA DAS AMOSTRAS	32
4.3. COLETA DAS CONSTANTES FISIOLÓGICAS E SINAIS CLÍNICOS	35
4.4. SOROLOGIA	36
4.4.1. TRIAGEM	37
4.4.2. TITULAÇÃO	39
4.5. ESTUDO ESTATÍSTICO	40
5. RESULTADOS	41
6. DISCUSSÃO	45

7. CONCLUSÃO	48
8. REFERÊNCIAS	49
ANEXO 1	57
ANEXO 2	58
ANEXO 3	59

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença infecciosa mundialmente disseminada, sendo considerada uma zoonose de grande importância, tendo maior prevalência em países em desenvolvimento. Seu agente etiológico é a *Leptospira interrogans*, que possui diversos sorovares (FAINE et al., 2000). É prevalente em regiões com alto índice pluviométrico e clima quente, porém, fatores como a exposição ao hospedeiro e presença de animais reservatórios domésticos ou silvestres, podem influenciar na distribuição geográfica da doença (SYKES et al., 2011).

Apresenta como fonte de infecção os diversos reservatórios que mantem o agente circulante na natureza, sem apresentar sinais severos da doença, porém, contaminando o ambiente (LEVETT, 2001). Entre os animais domésticos que mantem contato direto com os seres humanos, o cão é considerado como principal fonte de infecção para o homem, pois, os mesmos podem eliminar *Leptospiras spp.* vivas no ambiente por longo período sem apresentar sintomatologia clínica (MAGALHAES et al., 2006).

Os cães podem adquirir a enfermidade através do contato com a urina ou tecidos de animais infectados, além da ingestão de comida e alimentos contaminados com urina de ratos (*Rattus norvegicus*) ou de outros animais domésticos e silvestres que podem albergar o microrganismo sem apresentar nenhuma sintomatologia clínica (ADLER et al., 2010).

A doença pode se manifestar nos cães desde a forma assintomática até quadros clínicos graves. Os principais sinais clínicos observados na infecção aguda são: apatia, icterícia, anorexia, êmese, febre, poliúria, polidipsia, dor abdominal, diarreia, mialgia, hematúria, hematoquesia, petéquias e sufusões em conjuntivas e mucosas. Ainda pode haver uma rápida evolução da doença para a morte, antes mesmo do animal desenvolver sinais hepáticos e/ou renais mais específicos (NELSON e COUTO, 2006).

Para o diagnóstico da leptospirose, a técnica recomendada é a Soroaglutinação Microscópica, pois permite a detecção de anticorpos sete a dez dias após a infecção (TEIXEIRA, et al, 2008). Outros exames laboratoriais como hemograma completo, avaliação bioquímica sérica, urinálise e identificação da bactéria em tecidos apropriados, associados aos sinais clínicos apresentados pelo animal podem auxiliar no diagnóstico (ANDRADE et al, 2008).

O tratamento pode variar de acordo com cada caso específico. É baseado na administração de antibióticos de diferentes formulações e doses, associados a correção de distúrbios hidroeletrolíticos através da fluidoterapia, quando necessário. A prevenção inclui instalação e cuidados com saneamento básico no ambiente e vacinação dos animais expostos ao risco de infecção (GUIDUGLI, 2000; GOLDSTEIN, 2010).

Tendo em vista a importância da leptospirose canina e sua elevada casuística na clínica médica de pequenos animais, este trabalho é relevante por propor um estudo da soroprevalência da leptospirose em cães domiciliados e os sinais clínicos por eles apresentados em bairros de Cruz das Almas, Bahia que apresentam condições ambientais favoráveis para que ocorra a enfermidade.

2.0. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desse trabalho foi realizar investigação da ocorrência da leptospirose canina e a correlação com os sinais cl utilizando amostras coletadas em quatro bairros do município de Cruz das Almas – Bahia, avaliando aspectos clínicos e sorológicos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar comunidades de Cruz das Almas-BA com presença de cães soropositivos para leptospirose.

- Utilizar teste de microaglutinação de contrate de fase para detectar soros positivos para diferentes sorogrupos de *Leptospira spp.*

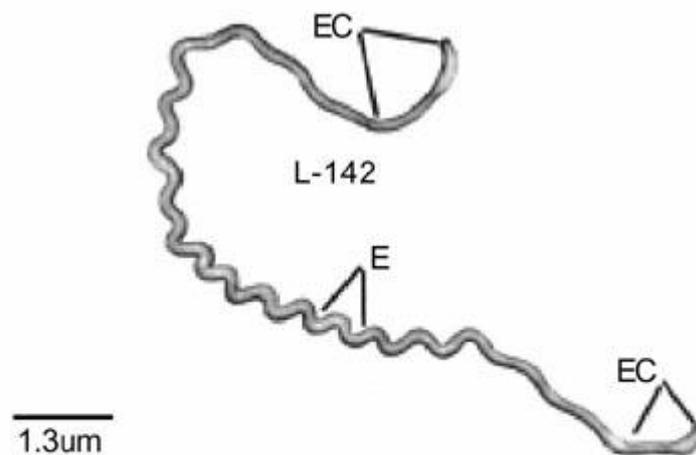
- Avaliar clinicamente os cães submetidos a coleta de sangue para uma correlação futura.

3.0. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. ETIOLOGIA

A leptospirose é causada por bactérias que pertencem ao Filo Spirochaete, Ordem Spirochaetales, Família Leptospiraceae e Gênero *Leptospira* (BHARTI, 2003). São gram-negativas, aeróbias obrigatórias e à microscopia de campo escuro observa-se morfologia em espiral e a presença de um gancho em suas extremidades, como mostra a figura 1 (COSTA et al., 2001; MARCHRY et al., 2010). Também chamadas de espiroquetas, possuem em média 0,1 a 0,2 μm de largura por 6 a 12 μm de comprimento. São moveis e giram sobre o próprio eixo longitudinal (NELSON E COUTO 2006).

Figura 1 - Microscopia eletrônica de *L. biflexa*, sorovar *Andamana*, cepa JNS.



Tamanho 11 x 0,1 μm , com 16 espiras (E) e ambos extremos curvados (EC). Aumento de 15000x.

Fonte: <http://www.scielo.org.pe/scielo.php?scripttext&pid=S172646342005000400007>

Segundo a classificação taxonômica clássica, baseados em seus sorogrupos, sorovares e na patogenicidade, *Leptospiras spp.* podem ser divididas em dois grupos: patogênicas e saprófitas. As espécies patogênicas que podem infectar o homem e os animais compreendem em: *L. alexanderi*, *L. borgpetersenii*, *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. weilii* e *L. alstoni*, *L. broomii*, *L. fainei*, *L. inadai*, *L. wolffii* e *L. licerasiae*, estas possuem mais de 200 sorovares

agrupados em 23 sorogrupos. Já o grupo das *Leptospira spp.* saprófitas, possuem 38 sorovares agrupados em 6 sorogrupos correspondente a *L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. wolbachii*, *L. kmetyi*, *L. vanthiellii*, *L. terpstrae* e *L. yanagawae*, são encontradas principalmente em água doce, apresentando poucos registros de infecção ao homem e aos animais (MATTHIAS et al., 2008). De acordo com Levett (2001), os cães podem se infectar por diferentes sorovares da espécie *L. interrogans*, sendo a *icterhaemorrhagiae*, *grippotyphosa*, *pomona* e *bratislava* os mais comuns de causar infecções.

Leptospira spp. são bactérias sensíveis ao ressecamento, congelamento, calor extremo (50°C por 10 minutos), ambientes ácidos, tecidos em putrefação, luz solar direta, desinfetantes comuns e antissépticos (FAINE et al., 2000; LEFEBVRE, 2003). Considera-se ambientes favoráveis para sua sobrevivência, áreas como água, solos, lamas, rios, o contato com seus reservatórios e hospedeiros acidentais. As condições ideais para sua manutenção no ambiente incluem água estagnada com pH levemente alcalino (variando entre 7,2 e 7,4), associado a temperatura que pode variar entre 28°C a 30°C (TEXEIRA et al., 2008; OLIVEIRA, 2010). As espécies saprófitas sobrevivem e se multiplicam na água, no entanto os mecanismos de sobrevivência no ambiente ainda são desconhecidos (PICARDEAU et al., 2008).

3.2. CARACTERÍSTICAS DE CULTIVO E CRESCIMENTO

As *Leptospiras spp.* são microrganismos quimiorganotróficos, ou seja, utilizam como fonte de energia compostos orgânicos e ainda oxigênio como acceptor final da cadeia de transporte de elétrons (NASCIMENTO et al., 2004a).

São cultiváveis em meios naturais contendo albumina bovina ou soro de coelho, sendo também possível cultivá-las *in vitro* em meios de cultura artificiais como o Fletcher, Stuart ou de EMJH. O meio mais utilizado entre os artificiais é o EMJH, que possui ácidos graxos complexados e sorbitol como fonte de carbono, e ainda a albumina sérica bovina como agente detoxificante. Ainda pode ser feita a associação entre o meio artificial EMJH e o soro de coelho numa concentração de 8 a 12% como fonte de cianocobalamina, albumina, ferro, ácidos graxos e outros nutrientes (LOMAR et al., 2002). Ainda, de acordo com Lomar (2002), *Leptospira spp.* podem ser isoladas por inoculação de material estéril em hamsters e cobaias.

Culturas apresentam crescimento ideal, com tempo de incubação que pode variar de 2 dias até 26 semanas em condições de temperatura entre 28 e 30°C associado ao pH de 7,2 a 7,6 considerado como ótimo. A densidade das culturas podem atingir concentração de 10^7 a 10^8 células/mL, com aparente turbidez macroscópica a partir do quarto ou quinto dia de cultivo (QUINN et al., 2005, FAINE, et al., 2000).

3.3. CARACTERÍSTICAS ANTIGÊNICAS

Leptospira spp. apresentam uma estrutura celular semelhante a de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, porém, com características singulares como a presença de uma membrana dupla em que a membrana citoplasmática e a parede celular formada por peptidoglicanos estão estreitamente associadas e cobertas por uma membrana externa. Por apresentarem estas características, tais bactérias não são coradas por Gram e suas dimensões reduzidas não permitem sua visualização através da microscopia óptica convencional, sendo facilmente visualizadas por microscopia de campo escuro, contraste de fase, por técnicas de impregnação pela prata, ou ainda imunofluorescência e imunoperoxidase (AVELAR & PEREIRA, 2005; CULLEN et al., 2004; VIJAYACHARI et al., 2008).

Na membrana externa estão distribuídos os LPSs que são compostos por três segmentos ligados de forma covalente, são eles: o lípidio A, que é uma porção lipídica altamente conservada responsável por ancorar o LPS à membrana externa celular; o *core* que consiste em uma porção polissacarídica que forma a região intermediária; e mais externamente encontra-se o antígeno O, considerado como o principal agente antigênico dos LPSs das bactérias gram-negativas (FAINE et al., 1999).

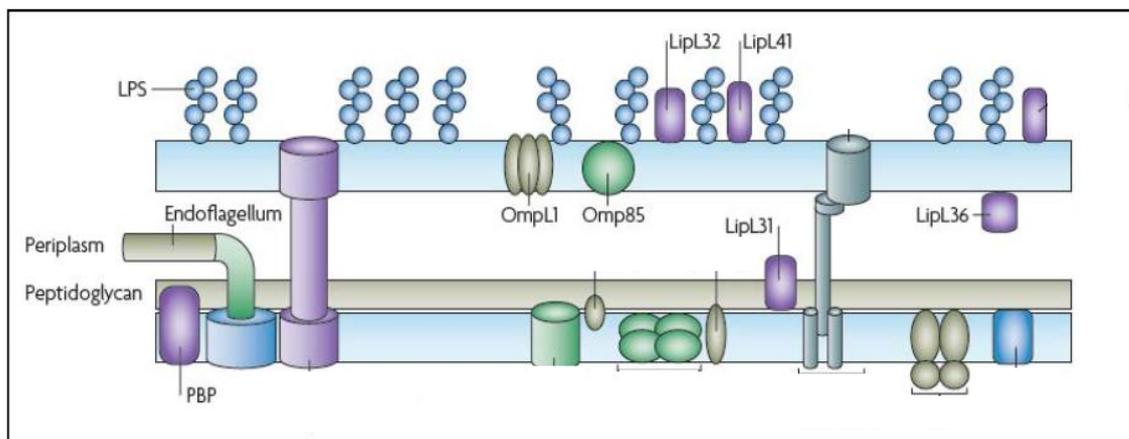
Os LPSs de membrana diferenciam a superfície das *Leptospiras spp.* de outras bactérias da ordem *Spirochetales*. Durante a biossíntese de LPS, ocorrem mudanças nos genes envolvidos, considerado como um mecanismo de adaptação a novas espécies de hospedeiros, influenciado também na diversidade de sorovares patogênicos (NASCIMENTO et al., 2004b).

Entre as espécies patogênicas de *Leptospira spp.* (*L. interrogans*), são encontrados genes que contém a expressão de proteínas importantes para a

sobrevivência e atividade desses microrganismos. Essas proteínas localizam-se na porção externa das membranas, garantindo a interação entre o microrganismo e o hospedeiro durante a infecção bacteriana, como é o exemplo da LipL 41 e a LipL 32, lipoproteínas ancoradas pela porção N-terminal. O tecido epitelial do hospedeiro estimula genes do microrganismo a codificar proteínas que vão facilitar o processo de infecção. (SEIXAS et al., 2007; MATSUNAGA et al., 2007) (Figura 2).

Segundo Haake (2002) e Gabriel (2006), uma terceira lipoproteína, a LipL 36 é sinalizada quando a bactéria entra em contato com a superfície do hospedeiro, onde sua função é neutralizar os anticorpos ali presentes, permitindo a entrada da mesma. A membrana externa da bactéria contém a proteína transmembrânica OmpL que associada a LipL 41 induz a imunoproteção à bactéria contra fagocitose realizada pelos macrófagos (Figura 2).

Figura 2 - Composição da parede celular das leptospiras.



Fonte: Adaptado de Picardeal et al., (2009).

Estruturas denominadas exopolissacarídeos são responsáveis pela formação de uma cápsula que forma um biofilme que vai promover proteção as bactérias contra o estresse osmótico e hídrico que podem ocorrer quando entram em contato com água, solo ou para auxiliar na persistência da infecção, quando se alojam nos túbulos renais do hospedeiro (CULLEN et al., 2002; RISTOW et al., 2008).

3.4. TRANSMISSÃO

Ocorre através do estabelecimento de um ciclo que envolve a interação entre reservatórios animais, ambiente favorável e grupos de animais susceptíveis ao agente. O grau de ocorrência da doença está diretamente relacionada com a quantidade de infectados na região (LEMOS et al., 2010; IBARRA et al., 2003).

A transmissão da leptospirose pode ocorrer de duas formas, direta ou indireta. A forma direta se dá pelo contato com sangue ou urina de animais doentes, feridas por mordedura, pela ingestão de tecidos infectados (abortos ou corrimento uterino), via transplacentária ou ainda através da cópula, se o animal portador encontrar-se no período de leptospiremia, onde o microrganismo estará presente no sêmen (LEVETT, 2001; SESSIONS et al., 2004; QUINN et al., 2005). Já a transmissão indireta ocorre através da exposição do animal susceptível à água, solo ou pela ingestão de alimentos contaminados (TEXEIRA et al., 2008).

A prevalência da leptospirose depende de um animal portador que é o disseminador da doença, denominado hospedeiro. Várias espécies animais podem se comportar como hospedeiro e cada sorovar tem um ou mais hospedeiros com diferentes níveis de adaptação. Os microrganismos infectam outros indivíduos da mesma espécie que também se tornarão reservatórios, ou então contaminam indivíduos de espécies diferentes gerando os hospedeiros acidentais (OLIVEIRA et al., 2004).

Os cães podem adquirir a infecção pela convivência com outros cães contaminados, bem como ratos com maior destaque para as espécies *Rattus rattus* e *Rattus norvegicus* que urinam em áreas comuns ou ainda pelo contato com outros animais domésticos, de produção ou silvestres. A espécie canina é considerada a principal fonte de transmissão da leptospirose para os seres humanos em áreas urbanas, devido ao estreito contato entre ambos, sendo que os cães podem eliminar leptospirosas vivas através da urina durante vários meses, mesmo sem apresentar nenhum sinal clínico característico (MAGALHÃES et al., 2006; ADLER et al., 2010).

3.5. EPIDEMIOLOGIA

A leptospirose é uma doença prevalente em regiões geográficas com altos índices pluviométricos e clima quente, constituindo um problema sanitário de grande importância. É mais frequente em grandes centros urbanos onde encontra ambientes favoráveis como áreas com acúmulo de lixo e esgotos a céu aberto, além

das regiões periféricas de pobreza que favorecem a disseminação e a manutenção do agente infeccioso de maneira permanente (SYKES et al., 2011; JASZCZERSKI, 2005).

É uma zoonose com elevada prevalência entre os animais domésticos, silvestres e humanos. Sua epidemiologia é caracterizada por uma espécie de hospedeiro primário que atua como reservatório para cada sorovar. O cão é o reservatório para o sorovar *Canicola*, enquanto que, os ratos são considerados reservatórios do sorovar *Icterohaemorrhagiae*. Os demais sorovares estão associados a várias espécies de reservatórios como ruminantes, equinos, suínos e animais selvagens (Tabela 1), com destaque para os roedores e carnívoros que liberarem as espiroquetas no ambiente por meio da leptospiúria transitória ou permanente (LANGONI et al., 2002; WARD, 2002).

Tabela 1 - Exemplos de sorovares de *Leptospiras spp.* e seus hospedeiros de manutenção.

Sorovar	Hospedeiro de manutenção
<i>Canicola</i>	Cães
<i>Icterohaemorrhagiae</i>	Ratos
<i>Grippotyphosa</i>	Guaxinis, ratos-calungas, gambás e esquilos
<i>Wolffi</i>	Morcegos
<i>Pomona</i>	Bovinos, suínos, gambás
<i>Bratislava</i>	Suínos, ratos, cavalos
<i>Hardjo</i>	Bovinos, ovelha
<i>Ballum</i>	Camundongos
<i>Bataviae</i>	Cães, ratos, camundongos
<i>Cynopteri</i>	Morcegos
<i>Tarassovi</i>	Suínos e bovinos
<i>Copenhageni</i>	Ratos

Fonte: Adaptado de BHARTI et al. (2003), SENSSIONS e GREENE (2004), NELSON e COUTO (2006).

Do ponto de vista epidemiológico, os cães desempenham um papel importante no ciclo da doença, pois se comportam como sentinelas, alertando

quanto à introdução de um novo sorovar de importância zoonótica, ou como indicadores de contaminação ambiental (BLAZIUS et al., 2005).

O grande número de sorovares de *Leptospiras spp.* descritos pode dificultar os estudos epidemiológicos, pois ocorrem variações regionais, bem como variações nas espécies estudadas. Pesquisas revelam que há uma certa predileção dos diferentes sorovares por determinadas espécies de animais, podendo um hospedeiro ser infectado simultaneamente por mais de um sorovar (ACHA et al., 2003).

3.6. RESPOSTA IMUNE

O sistema imune dos mamíferos é composto pela imunidade inata, o primeiro a ser ativado pelo sistema de defesa do hospedeiro contra o agente invasor e adaptativa que é mediado por células T antígeno-específicas e células B. (SHRÖPPEL et al., 2006).

A resposta imune do hospedeiro à leptospirose está diretamente relacionada aos eventos patológicos da doença. Os produtos das bactérias como GLP, LPS e peptidoglicano vão estimular a ativação de macrófagos, levando a secreção de TNF- α e IL-1, formando infiltrados leucocitários nos sítios da infecção. Além de estimular a produção das citocinas, o LPS ativa a via alternativa do complemento resultando em fagocitose ou opsonização dos microrganismos (CINCO et al., 1996).

Os monócitos que são ativados vão secretar TNF- α , induzindo a inflamação local e sistêmica além de IL-1, IL-6 e IL-8, importantes no controle da infecção e que estão envolvidas no processo inflamatório (SLIFKA, 2000; HITTON, 2000).

Segundo Monteiro (2003), a imunidade na leptospirose é predominantemente humoral e as imunoglobulinas são produzidas entre o segundo e décimo dia após a infecção dependendo da resposta imune do hospedeiro, da espécie acometida e do sorovar infectante. Esse tipo de resposta imune, foi demonstrada através de testes sorológicos, em que se observou maior atividade das imunoglobulinas da classe IgG e IgM, após a infecção, seja ela natural ou por imunização (MARINHO, 2008).

Em relação as *Leptospiras spp.* não patogênicas ou avirulentas, estas são eliminadas já no primeiro momento da infecção através das barreiras inatas de defesa (AVELAR et al., 2005).

3.7. PATOGENIA

A patogenia da leptospirose é dinâmica e depende de fatores variados. Após a penetração da *Leptospira spp.* no organismo através de cortes ou abrasões na pele, das mucosas, inclusive conjuntiva, ou ativamente através da pele íntegra após contato prolongado em água contaminada ou urina, ocorre uma rápida disseminação da bactéria no sangue, favorecendo sua multiplicação, com duração média de 3 a 10 dias. Este período é denominado como fase de leptospiremia e compreende a primeira fase da doença, não imune, onde o animal pode apresentar sintomatologia branda e inespecífica. A partir desse momento, *Leptospira spp.* se disseminarão em diversos tecidos como baço, sistema nervoso central, olhos, trato genital e principalmente nos rins e fígado (FAINE et al., 2000).

Com o comprometimento dos órgãos, é iniciada a segunda fase da doença, por volta do sétimo dia após a infecção. Esta é denominada como fase imune ou leptospirúria que causa a sintomatologia clássica e é caracterizada pela eliminação dos microrganismos através da urina. Os rins infectados estarão comprometidos e apresentarão nefrite túbulo-intersticial, com poucos focos inflamatórios linfocitários, necrose tubular e hemorragias. *Leptospiras ssp.* são encontradas em grande número nos túbulos contorcidos proximais, glomérulos e interstício (NALLY et al., 2004; YANG et al., 2006b). A eliminação urinária das bactérias passa a ser intermitente, podendo persistir por longos períodos, dependendo da espécie animal acometida e sorovar envolvido. Essas alterações podem ser reversíveis se o tratamento for iniciado precocemente, caso contrário, as *Leptospiras ssp.* se instalam, tornando-se viáveis nos túbulos renais, levando o animal ao estado de portador crônico assintomático (YANG et al., 2001).

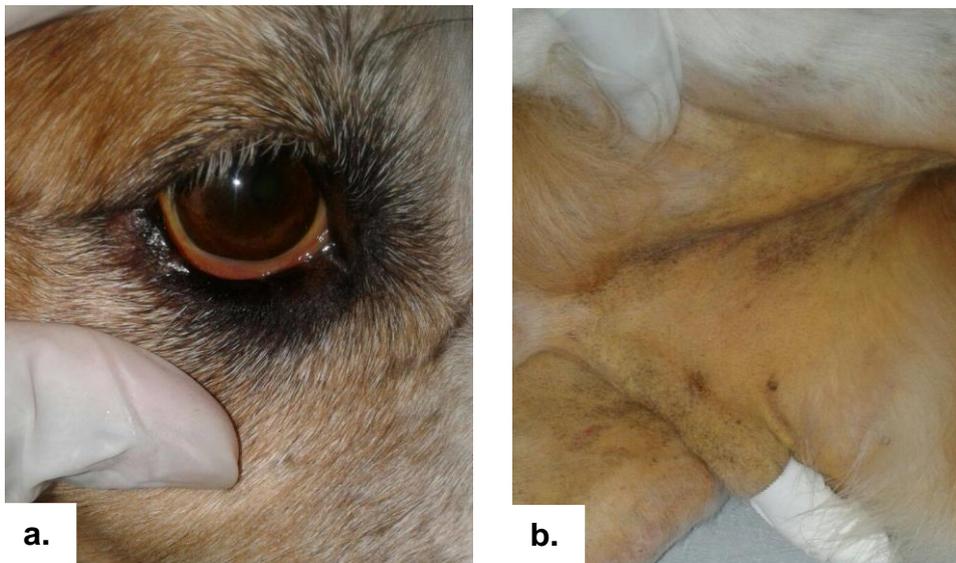
3.8. SINAIS CLÍNICOS

Os sinais clínicos desenvolvidos por um cão acometido pela leptospirose dependem de fatores como idade, virulência do sorovar, grau de exposição a doença e reposta imune do hospedeiro (SANTIM et al., 2006). A enfermidade é caracterizada por apresentar diversos sinais clínicos inespecíficos, onde os animais infectados podem apresentar desde um quadro assintomático onde não demonstram

nenhuma sintomatologia clínica até a forma superaguda, aguda, subaguda ou crônica da doença (FREIRE et al., 2008).

Cães com a doença clínica superaguda, apresentam em sua maioria sinais clínicos como anorexia, depressão, hiperestesia muscular generalizada, taquipnéia, taquicardia, êmese, febre e mucosas hipocoradas. Petéquias, equimoses, melena e epistaxe podem ocorrer devido a trombocitopenia e coagulação intravascular disseminada, sendo que estes podem evoluir rapidamente, causando a morte antes mesmo de haver um comprometimento renal ou hepático evidente. Já os caninos infectados de forma subaguda podem apresentar febre, depressão, conjuntivite, panuveíte, sinais clínicos ou achados de exame físico que indiquem síndromes hemorrágicas, doença hepática, como principal sinal clínico a icterícia (Figura 3), doença renal ou uma combinação das duas últimas (NELSON et al., 2006).

Figura 3 - Icterícia significativa distribuída em órgãos e tecidos de um cão acometido pela leptospirose.



a. Icterícia em esclera; b. Icterícia em região ventral. Fonte: Arquivo pessoal, (2016).

Na forma aguda, pode causar a morte do animal por insuficiência renal e hepática e aqueles que sobrevivem à infecção, tornam-se portadores e excretam leptospirosas pela urina de forma assintomática, disseminando a doença para outros cães, outras espécies animais e para o homem (GREENE, 2006). Nos casos em que a leptospirose é classificada como crônica, o animal pode apresentar sinais como poliúria, polidipsia, perda de peso, ascite e a encefalopatia hepática devido à insuficiência hepática desenvolvida (NELSON et al., 2006).

3.9. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da leptospirose é essencial para a escolha do tratamento precoce e prognóstico do paciente, e baseia-se nos achados clínicos, sorológicos, e na detecção e isolamento do agente (RUBEL et al., 2005).

3.9.1. DIAGNÓSTICO CLÍNICO

É baseado em alterações apresentadas pelo animal, principalmente por aqueles que não são vacinados, com histórico de acesso à rua ou que tem contato com roedores, porém, os sinais clínicos e clínicos patológicos não são específicos e muitas vezes o diagnóstico é de suspeita. Cães com hepatite, insuficiência renal, alterações entéricas, febre e anorexia, chamam a atenção para possível infecção, sendo que os machos, sem raça definida, com idade variando entre quatro e dez anos, apresentam maior suscetibilidade (LANGONI et al., 2000; WARD et al., 2002).

3.9.2. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico de referência para a leptospirose é feito através do Teste de Soroaglutinação Microscópica (Microscopic Agglutination Test ou MAT). Este é um teste específico e sensível na segunda fase da doença, caracterizada como fase imune tardia, permitindo a titulação sorológica e a identificação do sorovar responsável pela infecção, sendo considerada como uma importante ferramenta epidemiológica. Apesar de ser uma técnica bastante utilizada, possui baixa sensibilidade em quadros agudos iniciais e crônicos, pois nestes momentos, os títulos de anticorpos podem ser indetectáveis ou muito baixos, respectivamente (LEVETT, 2001; CRODA et. al., 2007).

Outras técnicas sorológicas foram desenvolvidas, como o teste de imunoenensaio sorológico (ELISA) para detecção de IgM, porém, possui baixa sensibilidade para o diagnóstico da doença na fase aguda, sendo capaz de detectar pacientes positivos após a primeira semana da infecção (BAJANI et al., 2003; SENTHILKUMAR et. Al., 2008).

Associados aos dados sorológicos, exames como hemograma completo e bioquímica sérica permitem uma caracterização mais rápida do quadro clínico, facilitando o diagnóstico da doença. A leptospirose pode induzir leucocitose com neutrofilia e anemia oriundas da hemólise intravascular. A trombocitopenia também pode ser visualizada e alterações renais e hepáticas podem estar presentes. Dados mostram que a azotemia pode ocorrer devido à redução da perfusão renal e da taxa de filtração glomerular que associa-se à destruição das células do epitélio renal pela ação de toxinas que estão presentes na composição da membrana das *Leptospiras spp.* (GREENE et al., 2006; LANGSTON et al., 2003). Já as alterações relacionadas aos níveis séricos de ALT e FA, enzimas que avaliam a integridade do fígado e vesícula biliar, podem estar relacionadas com danos celulares ao órgão e colestase respectivamente.

Ainda para auxiliar no diagnóstico da leptospirose, o cultivo microbiológico é possível através do isolamento do agente a partir de secreções como urina ou fetos abortados por técnicas de imunofluorescência. Outras técnicas como coloração pela prata e microscopia de campo escuro têm sido utilizadas para demonstrar as leptospiras em tecidos. (QUERINO et al., 2003).

3.9.3. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

É importante que se faça o diagnóstico diferencial para outras enfermidades, como anemia hemolítica imunomediada, hepatite infecciosa canina, erliquiose, riquetsiose, toxoplasmose e insuficiência renal, pois as mesmas apresentam sinais clínicos comuns com a leptospirose canina (TILLEY et., 2003).

3.10. TRATAMENTO

O tratamento da leptospirose canina pode variar de acordo com cada caso específico e se baseia na reposição do equilíbrio hidroeletrólítico, energético e no uso de antimicrobianos (GUIDUGLI, 2000; SESSIONS et al., 2004). Nos casos em que a doença é classificada como aguda grave, a terapia de suporte é recomendada e esta deve ser estabelecida a partir dos sinais clínicos apresentados pelo animal. A fluidoterapia é a base do tratamento, onde animais que estejam apresentando

choque devem ser tratados agressivamente com fluidos intravenosos, de preferência o Ringer Lactato e a desidratação deve ser corrigida no intervalo de 6 a 24 horas. Após a correção da desidratação a fluidoterapia deve ser mantida para estimular a diurese e, se necessário, diuréticos podem ser administrados devido aos danos renais causados pelas bactérias. Em casos graves de anemia severa, coagulação intravascular disseminada ou hipoalbuminemia acentuada a transfusão de plasma ou de sangue fresco total pode ser necessária (NOEL, 2004).

Leptospira spp. são sensíveis à vários antibióticos comercializados (Tabela 2) e o estabelecimento da antibioticoterapia deve acontecer logo após o diagnóstico ou suspeita da doença. A terapia será responsável pela redução da bacteremia em poucas horas, pois inibem a multiplicação do microrganismo na corrente sanguínea e tecidos e conseqüentemente as complicações fatais como falência renal e hepática. Porém, em contra partida, esses fármacos não são capazes de reverter alterações patológicas já instaladas (GREENE et al., 2006). Inicialmente os cães podem ser tratados com ampicilina administrada por via intravenosa ou penicilina G administrada por via intramuscular ou intravenosa (NELSON et al., 2006). Associados a antibioticoterapia inicial ou em casos em que o animal é considerado como um portador crônico, a doxicilina, estreptomicina e diidroestreptomicina são exemplos de fármacos que podem ser utilizados por serem responsáveis pela eliminação da infecção renal que propicia a contaminação do ambiente. É importante que a antibioticoterapia completa seja realizada por, pelo menos, quatro semanas (FAINE et al., 2000; BURR et al., 2009).

Tabela 2 - Antimicrobianos comercializados que podem ser utilizados para o tratamento da leptospirose em cães.

Droga	Dose	Via	Intervalo	Duração
<i>Penicilina G</i>	25.000 a 40.000 U/kg	IM, SC, IV	BID	14 dias
<i>Ampicilina</i>	22 mg/kg	VO, SC, IV	TID/QUID	14 dias
<i>Amoxicilina</i>	22 mg/kg	VO	BID/TID	14 dias
<i>Doxicilina</i>	5mg/kg	VO, IV	BID	14 dias
<i>Tetraciclina</i>	22 mg/kg	VO	TID	14 dias
<i>Eritomicina</i>	15-20mg/kg	VO, IV	BID/TID	14 dias
<i>Azitromicina</i>	10 mg/kg	VO	SID	5-7 dias
<i>Estreptomicina</i>	20mg/kg	VO	QUID	14 dias
<i>Diidroestreptomicina</i>	20mg/kg	VO	QUID	14 dias

Fonte: Adaptado de SESSIONS & GREENE (2004).

3.11. VACINAS

Devido à grande dificuldade de implantar medidas de prevenção nas populações mais afetadas, a vacinação dos animais torna-se um fator de extrema importância. As vacinas anti-leptospíricas existentes no mercado são compostas de uma suspensão bacteriana inativadas quimicamente, definida como bactéria dos sorovares mais prevalentes (*L. Canicola*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. grippityphosa* e *L. Pomona*). As bacterinas possuem inconvenientes como uma proteção de curta duração, havendo a necessidade de revacinação em menor intervalo de tempo, proteção incompleta contra sorovares não presentes na formulação e efeitos colaterais como reações de hipersensibilidade. Ainda não se tem certeza sobre o entendimento do mecanismo de imunidade protetora das vacinas composta por bacterinas. A camada de LPS parece conferir uma parte da imunidade humoral, havendo também a participação da resposta celular (FAINE et al., 2000; LEVETT, 2001; NAIMAN et al., 2001). Acredita-se, ainda que a vacina feita à base de bactéria não seja capaz de impedir que o animal desenvolva a fase de leptospirose ou poteje-lo em casos em que há uma grande exposição à bactéria (BOLIN, 2001; FONTAINE, 2003).

A vacinação dos cães utilizando vacinas contendo bacterinas específicas da região é de extrema importância como medida preventiva, pois, desse modo, há uma redução significativa da prevalência da leptospirose canina, evitando assim o estado portador que o animal pode exercer. Estudos já revelaram que os sorovares mais adaptados à espécie canina são *L. icterohaemorrhagiae* e *L. canicola*, entretanto, inquéritos sorológicos realizados nas diferentes regiões do Brasil, evidenciaram uma grande variabilidade de sorovares em diferentes localizações geográficas do país, com alta prevalência para o sorovar *copenhageni* (MANUAL DE ZOONOSES, 2011). Isso reforça a importância da pesquisa continuada no desenvolvimento de novas vacinas contra a leptospirose e a necessidade da inclusão de novos sorovares, visando à elaboração de vacinas mais efetivas, estimulando uma imunidade mais duradoura aos animais (BATISTA et al., 2005).

3.12. CONTROLE E PREVENÇÃO

Uma série de medidas devem ser implantadas para a realização do controle e prevenção da leptospirose canina e humana. Dentre elas podemos destacar as principais, relatadas por HAGIWARA, 2003; VASCONCELOS et al., 2012:

- O controle da população de roedores;
- Limitar o acesso dos cães a áreas pantanosas, lamacentas, lagos, áreas alagadas e pastagens altamente irrigadas, ambientes favoráveis à sobrevivência das leptospiros;
- Confinamento dos cães em domicílio e vacinação dos mesmos a cada seis meses;
- Isolamento e tratamento dos animais sintomáticos e suspeitos;
- Implantação de medidas de controle como investimentos no setor de saneamento básico com melhorias das condições sanitárias da população.

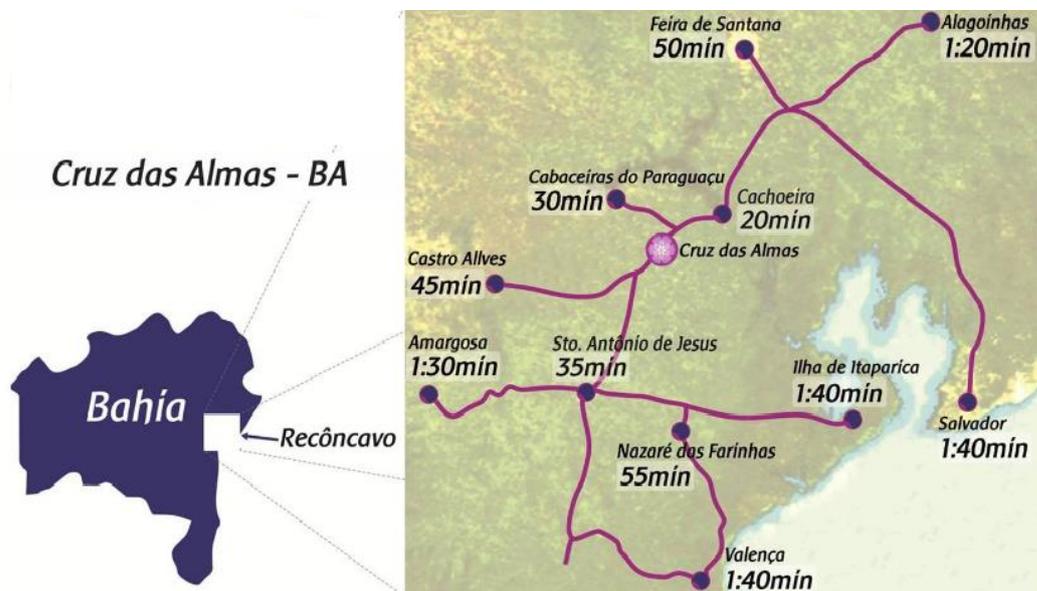
Ainda é importante destacar que pessoas que trabalham na limpeza de lamas, entulhos e desentupimento de esgoto ou médicos veterinários e outros profissionais que entram em contato com animais domésticos e silvestres susceptíveis à leptospirose, devem fazer uso de equipamentos de proteção individual como botas e luvas de borracha, reduzindo assim o potencial zoonótico da doença. (BRASIL, 2005).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. LOCAL DE ESTUDO

A pesquisa foi realizada no município de Cruz das Almas, situada no Recôncavo Sul da Bahia, Brasil (Figura 4). Localizada a 146 quilômetros da capital do Estado, Salvador, apresenta coordenadas geográficas de 12° 40' 12" S de latitude e 39° 06' 07" W de longitude, com clima tropical e pluviosidade anual de 1.136 mm³. Possui temperatura média de 23,0°C e sua população gira em torno de 63.299 habitantes, com densidade demográfica de 402,12 hab./km² (PREFEITURA DE CRUZ DAS ALMAS, 2015). O estudo foi aplicado em bairros aleatórios como Inocoop, Areal, Estrada de ferro e Tabela. O mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA da UFRB, protocolo n° 23007.004595/2016-83, seguindo os princípios Éticos na Experimentação animal (Anexo 1).

Figura 4 - Localização do município de Cruz das Almas, Bahia.



Fonte: <http://www.weather-forecast.com/locations/Cruz-das-Almas>

4.2. COLETA DAS AMOSTRAS

Antes da coleta do sangue para realização dos testes e avaliação das constantes fisiológicas, foi realizada uma pequena entrevista com o proprietário por meio de uma ficha de identificação do animal para obtenção de dados como nome

do animal, idade, raça, sexo, nome do proprietário, endereço e telefone para contato.

Foi aplicado aos responsáveis pelos animais um termo de consentimento e esclarecimento no qual o mesmo assinava e ficava com uma cópia. Nesse mesmo documento constava a permissão para utilização dos dados gerados e do material biológico coletado para que pudessem ser usado no presente trabalho e em futuras publicações científicas (Anexo 2).

Foram colhidas amostras de sangue de 200 cães (*Canis familiaris*) domiciliados, durante o período de fevereiro a dezembro de 2015, sem distinção de raça, sexo e idade. Para colheita do material, a veia de acesso variou de acordo com a idade e massa corporal dos cães sendo que, nos animais ainda filhotes ou em raças de pequeno porte, a venopunção foi procedida na veia jugular, enquanto que, em animais adultos ou de raças de médio a grande porte, a venopunção foi realizada na veia cefálica acessória, após antissepsia prévia com álcool a 70% (Figura 5). Não foi necessário realizar tricotomia no local da coleta.

Figura 5 - Venopunção da veia cefálica acessória em cão de médio porte.



Fonte: Arquivo pessoal, (2015).

Foram utilizadas seringas de 3mL e agulhas descartáveis com calibre 25x7 para cada cão. As amostras foram acondicionadas em tubos sem anticoagulantes para extração do soro e mantidas sob refrigeração (2 a 8° C) em caixa isotérmica. Posteriormente foram encaminhadas ao Laboratório de Doenças Infecciosas (LDI) da UFRB, no qual foram centrifugadas a 3.000 rpm, durante 10 minutos. O soro foi acondicionado em microtubos de plástico (Eppendorf) identificados de 1,5mL e mantido em freezer a -20° C, até o momento da realização da técnica de Soroaglutinação Microscópica (Figura 6).

Figura 6 - Aliquotagem das amostras.



Fonte: Arquivo pessoal, (2015).

A quantidade de amostras colhidas foi calculada com base na população total de cães da cidade, estimada a partir da população humana de 64.197 habitantes. Para o cálculo da proporção cão: homem, foi utilizada uma relação de 1:10 (REICHMANN et al., 1999), que resultou em um total de 6.420 cães. O cálculo foi feito no programa Microsoft Excel (versão 2010), considerando-se um nível de confiança de 95%, prevalência de 85% e erro estatístico de 5%, de acordo com a fórmula descrita abaixo, resultando no N amostral de 190 cães, onde, por motivo de segurança foram colhidas 200 amostras.

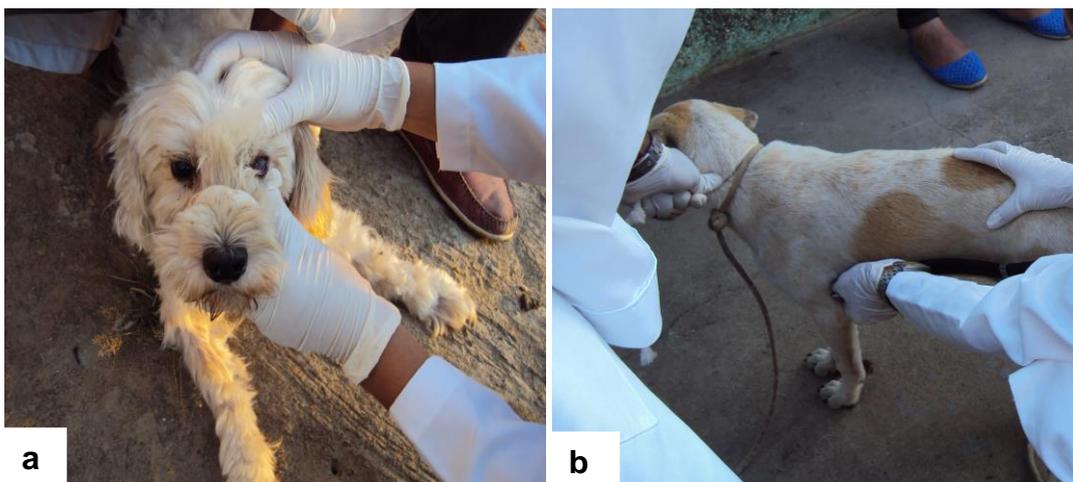
$$n = \frac{N \cdot Z^2 \cdot p \cdot (1-p)}{Z^2 \cdot P \cdot (1-p) + e^2 \cdot (N-1)}$$

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

4.3. COLETA DAS CONSTANTES FISIOLÓGICAS E SINAIS CLÍNICOS

Foi realizado o exame físico de todos os animais que tiveram o sangue coletado para obtenção de dados como frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura, TPC, coloração das mucosas, presença de escleras hiperêmicas, ceratoconjuntivite, presença de petéquias, presença de icterícia, linfadenomegalia, hidratação, algia à palpação abdominal sugestivo de aumento de órgão como fígado ou alterações renais, comportamento e se o proprietário havia observado nos dias anteriores alterações no apetite, êmese, presença de hematúria, hematoquezia e/ou epistaxe (Figura 7). Todos os dados foram registrados em uma ficha clínica específica (ANEXO 3). Os procedimentos foram realizados com animal devidamente contido, de forma cuidadosa e explicados ao proprietário.

Figura 7 - Avaliação do aspecto clínico dos animais.





a. Avaliação da mucosa ocular; b. Auscultação cardíaca; c. Avaliação dos linfonodos poplíteos; d. Aferição de temperatura.

Fonte: Arquivo pessoal, (2015)

4.4. SOROLOGIA

Para o diagnóstico sorológico da leptospirose, foi utilizado o teste Soroaglutinação Microscópica com Antígenos Vivos, preconizado pela OMS (FAINE et al., 2000). Foram utilizados 19 sorovares de leptospiras vivas (Tabela 3), fornecidas pela Fiocruz - Fundação Osvaldo Cruz, referência nos estudos voltados à leptospirose.

Tabela 3 - Relação de sorovares utilizados na Soroaglutinação Microscópica.

N° de antígenos	Sorogrupo	Variante do sorogrupo
01	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	<i>icterohaemorrhagiae</i>
02	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	<i>copenhageni</i>
03	<i>Canicola</i>	<i>canicola</i>
04	<i>Grippothyphosa</i>	<i>grippothyphosa</i>
05	<i>Pomona</i>	<i>pomona</i>
06	<i>Australis</i>	<i>australis</i>
07	<i>Bataviae</i>	<i>bataviae</i>
08	<i>Ballum</i>	<i>castellonis</i>
09	<i>Cynopteri</i>	<i>cynopteri</i>
10	<i>Javanica</i>	<i>javanica</i>
11	<i>Panama</i>	<i>panama</i>
12	<i>Pyrogenes</i>	<i>pyrogenes</i>
13	<i>Sejroe</i>	<i>hardjo</i>
14	<i>Sejroe</i>	<i>sejroe</i>
15	<i>Semarang</i>	<i>patoc</i>
16	<i>Tarassovi</i>	<i>tarassovi</i>
17	<i>Autumnalis</i>	<i>autumnalis</i>
18	<i>Hebdomadis</i>	<i>hebdomadis</i>
19	<i>Sejroe</i>	<i>wolffi</i>

Fonte: Elaboração da autora.

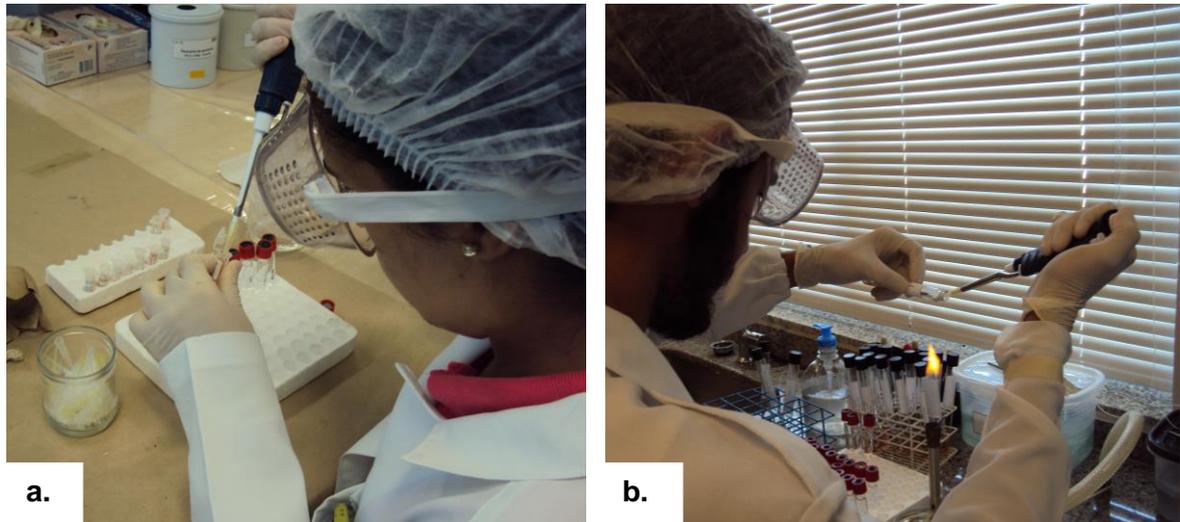
Para obtenção dos antígenos, foram realizadas cultivos de *Leptospira spp.* vivas a partir das matrizes mantidas no LDI da UFRB, repicadas a cada 7 dias em meio de cultura EMJH (Difco®), enriquecido com 10% de soro de coelho, mantido em estufa a 30°C. Foram realizadas avaliações quinzenais em microscopia de contraste de fase a fim de evitar a utilização de antígenos com contaminação, autoaglutinação ou mortalidade de *Leptospira spp.* O critério adotado para considerar um soro como reagente foi a aglutinação de pelo menos 50% de *Leptospira spp.* na diluição de 1:100.

4.4.1. TRIAGEM

Para a realização da triagem foram removidos 0,2 mL do soro de cada amostra e pipetados em tubos estéreis contendo 4,8 mL de NaCl, em uma proporção de 1:100 (Figura 8). Em seguida 0,2 mL das cepas de *Leptospiras spp.* foram adicionadas,

com auxílio de micropipetas, a 4,8 mL de NaCl também em meio estéril, sempre mantendo o cuidado de impedir a contaminação da material (Figura 8).

Figura 8 - Preparação das amostras de soro e cepas para titulação.

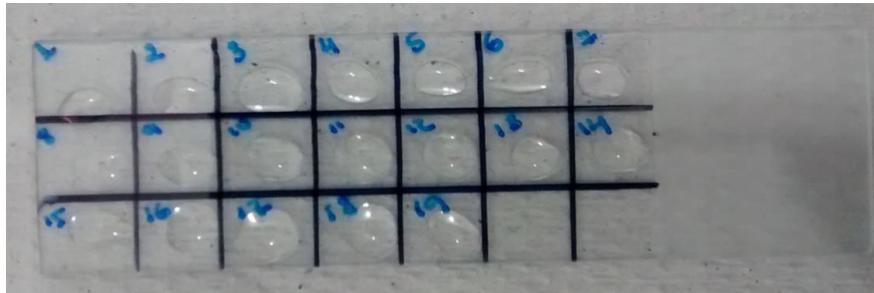


a. Diluição das amostras em NaCl; b. Diluição das cepas leptospiricas em NaCl.

Fonte: Arquivo pessoal, (2015).

Dando sequência ao processo, foram adicionados 200µl da diluição do soro de cada amostra em 19 eppendorfs devidamente organizados em estantes para cada amostra, e em seguida foram adicionados mais 200µl das suspensões antigênicas preparadas anteriormente. Ao final desse processo, as amostras foram mantidas em estufa bacteriológica a 37°C, durante 3 horas com o propósito de obter a aglutinação das amostras positivas. Para auxiliar na leitura, foram confeccionadas em laminas de vidro, marcações que delimitavam espaços onde foram pipetados 30µl das amostras a serem avaliadas (Figura 9).

Figura 9 - Lâmina de vidro com marcações confeccionadas para facilitar a leitura microscópica.



Fonte: Arquivo pessoal, (2015).

Para observação das aglutinações, foi utilizada microscopia de contraste de fase e eram considerados positivos aquelas amostras que apresentaram aglutinação igual ou superior a 50%. As amostras que apresentaram positividade para um determinado sorovar, foram novamente congelados para serem posteriormente utilizados na titulação.

4.4.2. TITULAÇÃO

A titulação foi realizada com 60 amostras que obtiveram resultado positivo na triagem. Nessa fase, os soros sofreram uma diluição de 1:50 na quantidade de 4,9 mL de solução salina para 0,1 mL do soro. Em seguida, com auxílio de uma micropipeta, foi removido da primeira diluição 0,2 mL e adicionado a um eppendorf que recebeu a identificação do título de 1:100 onde foi adicionado mais 0,2 mL do antígeno. Um segundo eppendorf, identificado com a numeração do título de 1:200, 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 1:400, recebeu 0,2 mL do conteúdo do 2º eppendorf mais 0,2 mL do antígeno. O 4º eppendorf com a identificação do título de 1:800, recebeu 0,2 mL da diluição do 3º eppendorf e mais 0,2 mL do antígeno. O 5º eppendorf representando uma titulação de 1:1600 recebeu 0,2 mL do antígeno e mais 0,2 mL da diluição do 4º eppendorf. Seguiram-se estes procedimentos até a titulação 1:3200. Todo o procedimento foi realizado em todos os positivos separadamente. Ao final desse processo, as amostras foram mantidas em estufa bacteriológica a 37°C, durante 3 horas para que ocorresse a aglutinação das amostras positivas nos variados títulos. Para a leitura, também foram utilizadas

lâminas com marcações que delimitavam espaços nos quais foram pipetados 30 μ l das amostras a serem avaliadas.

Para observação das aglutinações, foi utilizada microscopia de contraste de fase e eram considerados positivos aqueles que apresentaram aglutinação igual ou superior a 50% em cada titulação.

4.5. ESTUDO ESTATÍSTICO

As informações obtidas foram armazenadas em banco de dados da planilha do programa Microsoft Excel (versão 2010), na qual as distribuições das frequências foram calculadas. Para análise, buscou-se verificar a existência de diferenças significativas entre as variáveis estudadas e a presença de anticorpos anti-leptospira, para isso foi realizado a correlação não paramétrica de Tau-b de Kendall, o teste do Qui-quadrado ($\alpha < 0,05$), Odds Ratio e intervalo de confiança mediante software estatístico IBM SPSS Statistics (versão 20.0).

5. RESULTADOS

Dentre as 200 amostras de soro canino analisadas, 60 apresentaram resultados positivos para leptospirose, com títulos igual ou superior a 1:100, gerando prevalência de 30%. Na tabela 4, é possível observar o número de amostras de soro de cães reagentes e suas titulações, na qual o sorovar *javanica* foi o mais frequente, apresentando seis (15,4%) amostras positivas, seguido dos sorovares *castellonis*, *hardjo*, *sejroe* e *tarassovi* presentes em três (7,7%) amostras positivas. Também foram encontrados os sorovares *icterohaemorrhagiae*, *canicola*, *grippothyphosa*, *cynopteri*, *panama*, *pyrogenes*, *patoc* e *hebdomadis* com dois animais reagentes (5,1%) e os sorovares *copenhageni*, *pomona*, *bataviae*, *autumnalis* e *wolffi* com somente uma (2,6%) amostra positiva. Os cálculos foram feitos com as amostras positivas que não apresentaram coaglutinação (39/60).

Tabela 4 - Frequência da positividade de amostras sorológicas de cães da cidade de Cruz das Almas, Bahia, ao teste 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. Fonte: Elaboração da autora.

Das 60 amostras que demonstraram reação positiva, 21 delas apresentaram coaglutinação, ou seja, mais de um sorovar demonstrou titulação para uma mesma amostra de soro (Tabela 5), destacando o sorovar *Javanica*, o mais reagente, que apresentou coaglutinação com os sorovares *Castellonis*, *Panama* e *Patoc* (4,8%).

Tabela 5 - Coagulação de variados sorovares de *Leptospira spp.* encontrados em cães domiciliados no município de Cruz das Almas, Bahia.

Sorovar	Títulos						Total (%)
	100	200	400	800	1600	3200	
<i>Ictero./hardjo</i>	1	0	0	0	0	0	1 4,8%
<i>Cop./Bat./Cyno./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>Icter./cop./canic./grippe.</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>Javan./cast./pan/patoc</i>	1	0	0	0	0	0	1 4,8%
<i>Panama/ictero./grippe.</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%

Onde: 100 (1:100); 200 (1:200); 400 (1:400); 800 (1:800); 1600 (1:1600); 3200 (1:3200).

Fonte: Elaboração da autora.

No que diz respeito aos dados clínicos e constantes fisiológicas coletadas nos animais que fizeram parte da pesquisa, foi feita uma correlação não paramétrica (Tau-b de Kendall), pois este foi o método estatístico mais adequado para os dados da pesquisa considerados não paramétricos.

Os coeficientes de correlação para a sorologia foram considerados baixos mesmo entre as variáveis significativas. Dentre os dados obtidos como Idade, sexo, raça, frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura, TPC, coloração das mucosas, presença de icterícia, linfadenomegalia, hidratação, comportamento, apetite, êmese, algia à palpação abdominal, escleras hiperêmicas, ceratoconjuntivite, presença de petequias, hematúria, hematoquezia e presença de epistaxe, as variáveis ou sinais clínicos que apresentaram significância estatística foram: frequência cardíaca ($p= 0,002^{**}$), presente em 2% dos animais positivos; icterícia ($p= 0,032^*$) encontrada em 1% dos animais reagentes, hematúria ($p= 0,004^{**}$) representada por 2,5% dos animais acometidos e apatia ($p= 0,016^*$) observada em 3% dos animais positivos. As outras variáveis não apresentaram correlação significativa com os títulos considerados positivos nos cães avaliados. (Tabela 6).

Tabela 6 - Correlação entre sorologia positiva, sinais clínicos e constantes fisiológicas.

Variável	Sorologia 1:100				
	Negativo (%)	Positivo (%)	Odds Ratio	IC 95%	p-Valor
Frequência Cardíaca					
Normal	69,0	28,5	9,68	1,06 -	0,002 ^{**}
Alterado	0,5	2,0		88,54	
Icterícia					
Não	69,0	29,5	4,68	0,42 -	0,032 [*]
Sim	0,5	1,0		52,59	
Hematúria					
Não	69,0	28,0	12,32	1,41 -	0,004 ^{**}
Sim	0,5	2,5		107,85	
Apatia					
Não	68,0	27,5	4,95	1,19 -	0,016 [*]
Sim	1,5	3,0		20,48	

*Correlação ao nível de significância de 0,05 (p-valor). **Correlação ao nível de significância de 0,01 (p-valor). Fonte: Elaboração da autora.

6. DISCUSSÃO

O elevado percentual da positividade da leptospirose canina demonstra que esta é uma doença comum e muitas vezes subestimada, pois muitos animais se comportam clinicamente de forma assintomática.

A soropositividade em 60 cães domiciliados (30%), encontrada no presente trabalho realizado no município de Cruz das Almas – BA, assemelhou-se aos dados obtidos por Tesserolli et al., (2008) que encontrou 32,27% de positividade, em pesquisa realizada no município de Curitiba – PR e Castro et al. (2011), que realizou estudo em Uberlândia - MG, onde obteve 28,4% de soropositividade para leptospirose em cães.

Já o trabalho realizado por Jouglard e Brod (2000) no município de Pelotas, RS, apresentou menor soropositividade de 2,66%. A diferenciação nas porcentagens de positividade encontrada nos vários trabalhos realizados em diferentes regiões, podem ser explicadas pela variedade de fatores que podem influenciar na ocorrência da leptospirose canina, como por exemplo, topografia, temperatura, precipitação pluviométrica, umidade, contaminação de água e alimento, presença de reservatórios domésticos e selvagens, bem como a diferença nas populações caninas estudadas.

Dentre os 19 sorovares que fizeram parte do teste realizado, o sorovar *Javanica* foi responsável pela positividade de 15,4% dos animais avaliados, apresentando maior prevalência entre os sorovares estudados. Esse mesmo sorovar também foi encontrado em pesquisa realizada por Faccioli et al. (2007), sendo responsável por 6,25% da positividade, em pesquisa realizada no município de Botucatu – SP, enquanto Batista et al. (2004) encontrou 2,5% de animais soropositivos para leptospirose causado por este sorovar. Estudos relatam que o sorovar *Javanica* já foi encontrado em outras espécies animais como ratos (*Rattus norvegicus*) (VEDHAGIRI et al. 2010), teiús (*Tupinambis merianae*) (PAIXÃO et al. 2011), em equinos (*Equus caballus*) (MORAES et al., 2010) e ovinos (*Ovis aries*) (ECKSTEIN et al., 2014).

Os sorovares *Tarassovi*, *Hardjo*, *Castellonis* e *Serjoe* foram os mais encontrados depois do sorovar *Javanica* no presente estudo, representando 7,7% (cada) das amostras positivas. No trabalho realizado por Aguiar et al. (2007), onde foram avaliados cães criados em meios rurais, os sorovares *Tarassovi* e *Hardjo*

apresentaram maior prevalência, pois, os mesmos possuem os bovinos como hospedeiro de manutenção (CALDAS et al., 1991; ELLIS, 1994). Sobestiansky et al., (1999) ainda relata que os suínos também podem albergar o sorovar *Tarassovi*, confirmando a hipótese da possível transmissão entre as diferentes espécies (bovina, suína e canina), onde foi possível observar o contato direto entre essas espécies na área estudada. Segundo Brihuega et al., (1994), o sorovar *Castellonis* pode causar quadros mórbidos ou infecções benignas nos cães. Essa variedade de sorovares que apresentaram valores significativos na casuística da pesquisa demonstra que os cães mantiveram contato direto ou indireto com animais de variadas espécies, que podem servir como possíveis fontes de infecção para a doença, provavelmente existente na região.

Os sorovares mais comumente encontrados nos cães como *Icterohaemorrhagiae*, *Copenhageni* e *Grippothyphosa* ocorreram em baixa frequência entre os positivos (5,1%, 2,6% e 5,1%), corroborando com o trabalho realizado por Tesserolli et al., (2008) que encontrou somente 2,08% de positividade do sorovar *Icterohaemorrhagiae* em cães, demonstrando a possibilidade da influência de fatores ambientais característicos da região.

A ocorrência da coaglutinação presente neste trabalho, também foi encontrado em estudo realizado por Silva et al., (2009) na cidade de Botucatu – SP e Castro et al., (2011) em Uberlândia – MG. Este tipo de resultado pode ser justificado pela exposição do animal a mais de um sorovar, a variedade de reservatórios e o ambiente em que o animal vive (BARWICK et al., 1998).

Dos sinais clínicos encontrados nos animais que participaram do estudo, o aumento da frequência cardíaca tem estatisticamente correlação com os animais positivos (OR = 9,68). Na literatura, são raros os registros de que a leptospirose pode causar danos cardíacos em cães que possam gerar alterações na FC. Em pesquisa realizada por SYKES et al., (2011), foi possível observar alterações em ecocardiograma sugestivas de lesões em miocárdio de cães. Já Mastroilli et al., (2007), observou aumentos séricos da troponina em cães diagnosticados com leptospirose. A troponina é uma enzima que em humanos é utilizada como marcador de infarto do miocárdio. Segundo Silva, (2000), nos seres humanos a leptospirose pode causar miocardite com etiologia infecciosa, neste caso a leptospirose, onde alterações na frequência cardíaca podem acontecer.

Outro sinal clínico cuja a correlação apresentou significância estatística foi a icterícia (OR = 4,68). De acordo com Grenne et. Al., (2006), a icterícia ocorre principalmente devido a disfunção dos hepatócitos à níveis celulares, que acaba por comprometer a excreção e conjugação da bilirrubina, onde seus níveis estarão elevados, gerando o quadro de icterícia. Em um relato de caso registrado por Costa, (2013), o animal doente apresentava altos níveis de bilirrubina circulante, provavelmente induzidos por lesão hepática e anemia, que justifica a presença de icterícia pré-hepática e hepática. Outro trabalho realizado por Santin et al., (2006) constatou que em 65 animais que apresentaram soropositividade para leptospirose, 48,87% tinha a icterícia entre os sinais clínicos apresentados.

A hematúria (OR = 12,32) também é uma das variáveis que apresentaram relevância significativa no presente estudo. Esta é uma alteração inespecífica mas que pode estar presente em animais acometidos pela doença, na forma subaguda, onde esse sinal clínico pode estar associado a outras alterações como uremia, extensos danos renais e estomatite ulcerativa, sendo mais comum em animais acometidos pelo sorovar *Canicola* (YASUDA, 1980). Levett, (2001), descreve que a lesão endotelial é uma das principais ações das leptospirosas, e nos rins infectados pode causar focos inflamatórios, necrose tubular e hemorragias.

A apatia também foi um sinal clínico que apresentou relevância (OR = 4,95). De acordo com Santin et al., (2006), este é um sinal clínico inespecífico mas frequente nos registros dos casos de leptospirose canina, estando entre as principais alterações percebidas pelos proprietários. Em trabalho realizado pelo mesmo autor, 28,12% dos animais sororeagentes apresentavam apatia entre os sinais clínicos. O autor Wolh, (1996) afirmou que este sinal está presente em animais que já estejam com comprometimento renal, denominando a mesma de fase urêmica da doença.

As manifestações clínicas apresentadas pelo animais acometidos pela leptospirose pode variar de acordo com a susceptibilidade de cada indivíduo e o sorovar que esteja provocando a doença (GRENNE et al., 2005). Com relação aos outros sinais clínicos e constantes fisiológicas analisadas, não se confirmou correlação estatística, mesmo sendo estas, alterações frequentemente observadas em animais acometidos pela doença.

7. CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos no presente trabalho, foi possível compreender melhor a prevalência da leptospirose canina no município de Cruz das Almas – Bahia, e a maior frequência do sorovar *Javanica*, pouco relatado como causador da leptospirose nesta espécie.

Relacionando a positividade aos sinais clínicos e constantes fisiológicas pesquisadas, foi possível observar estatisticamente que a frequência cardíaca, icterícia, hematúria e apatia estão relacionadas de forma direta com a ocorrência da leptospirose nos cães, mesmo que animais doentes apresentem também outros sinais clínicos que foram pesquisados.

A importância da compreensão dos mecanismos envolvidos na doença como virulência do sorovar e a forma de manifestação clínica apresentada, representa ainda um grande desafio dentro das enfermidades infecciosas, porém, o seu entendimento possibilitará o desenvolvimento de estratégias terapêuticas e preventivas que ajudarão a combater o desenvolvimento da enfermidade.

Também é importante destacar a necessidade da elaboração de programas de controle da doença, através do uso de vacinas que contenham sorovares prevalentes na região, bem como estudos sobre a patologia, instalação de saneamento no meio ambiente e instalação de ações educativas, melhorando assim a qualidade de vida dos animais e seres humanos.

8. REFERÊNCIAS

- ACHA P. N., SZYFRES B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y los animales. 3° ed. Ashington: Organización pan-americana de la Salud; V. 1, p. 175-186, 2003.
- ADLER, B. & MOCTEZUMA, A.P. *Leptospira* and Leptospirosis. *Veterinary Microbiology*, v.140, n.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. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.59, n.1, p.70-76, 2007.
- ANDRADE, S.F. Manual de terapêutica veterinária, 3° ed. São Paulo: Roca, p.780-781, 2008.
- AVELAR, K.E.S; PEREIRA, M.M. Espiroquetídeos. In: TRABULSI, L.R., ALBERTUM, F. Microbiologia. 4ª ed. – revista e atualizada. São Paulo, p.405-408, 2005.
- BAJANI, M.D. et al. Evaluation of four commercially available rapid serologic tests for diagnosis of leptospirosis. *J. Clin. Microbiol.* n. 41, v.2, p.803-809, 2003.
- BARWICK R. S. et al., Epidemiologic features of equine *Leptospira interrogans* of human significance. *Prev Vet Med.* n.36, p.153-165, 1998.
- 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.* V. 57, supl. 2, p. 179-185, 2005.
- BATISTA, C. S. A. et al. 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.
- BHAETI, A. R. et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The lancet infectious Diseases*, v. 3, p.757-771, 2003.
- BIER, D. et al. Análise espacial do risco de leptospirose canina na Vila Pantanal, Curitiba, Paraná. *Pesquisa Veterinária Brasileira.* n 33. p.74-79, jan. 2013.
- BLAZIUS R. D., et al. Ocorrência de cães errantes soropositivos para *Leptospira* spp. na cidade de Itapema, Santa Catarina, Brasil. *Cad. Saúde Públ.* n.21, p.1952-1956, 2005.

BOLIN, C.A.; ALT, D.P. Use of a monovalent leptospiral vaccine to prevent renal colonization and urinary shedding in cattle exposed to *Leptospira borgpetersenii* Sorovar Hardjo. Am. J. Vet. Res. n.62, v. 4, p.995-1000, 2001.

BRASIL. Guia de Vigilância Epidemiológica. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 6 ed. Brasília. p.815, 2005.

BRIHUEGA B., HUTTER E. Incidência de la leptospirosis em caninos de la ciudad de Buenos Aires. Vet Argentina. n.11, 1994.

BURR, P.; LUNN, K.; YAM, P. Current perspectives on canine leptospirosis. In Practice, v. 3, p. 98-102, 2009.

C.A ADIN; COWGILL, L.D. Treatment and outcome of dogs with leptospirosis: 36 cases (1990-1998). Journal of the American Hospital Association, v.216, n.3, p.371-5, 2000.

CALDAS, E. M et al. Comportamento de estirpes apatogênicas no diagnóstico sorológico de leptospirose em animais. Arq. Esc. Med. Vet., UFBA. Salvador: n.14. v1. p.324, 1991.

CERQUEIRA, G. M.; PICARDEAU, M. A century of *Leptospira* strain typing. Infection, Genetics and Evolution, v.9, n.5, p.760-768, 2009.

CASTRO JR, Souza MA, Salaberry SRS, Lima-Ribeiro AMC. Sorovares de *Leptospira* spp. predominantes em exames sorológicos de caninos e humanos no município de Uberlândia, Estado de Minas Gerais. Rev Soc Bras Med Trop. v. 44, p. 217-222, 2011.

CINCO, M. et al. *Leptospira interrogans* and *Leptospira peptidoglycans* induce the release of tumor necrose fator α from human monocytes. FEMS Microbiol. Lett. n.138, p.211-214, 1996.

COSTA E., et al. Formas graves de leptospirose: aspectos clínicos, demográficos e ambientais. Soc. Bras. De Med. Tropical. v. 3, p. 261-267, 2001.

CRODA, J. et al. A *Leptospira* immunoglobulin-like proteins as a serodiagnostic marker for acute leptospirosis. J. Clin. Microbiol. n.45, v.5, p.1528-1534, 2007.

CULLEN, P. A. et al. Global analysis of outer mambrane proteins from *Lepstospira interrogans* sorovar Lai. Infect Immun. n.70, p.2311-2318, 2002.

CULLEN, P. A., HAAKE, D. A. ADLER, B. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. Microbiology Reviews, n.28, p.291-318, 2004.

ECKSTEIN, C. et al. Características dos rebanhos ovinos da região meio-norte de Mato Grosso associadas à ocorrência de anticorpos anti- *Leptospira* spp. In: IX Congresso Nordestino de Produção Animal, Ilhéus, 2014.

ELLIS, W.A. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. *Vet. Clin. N. Am.: Food Anim. Pract.*v.10, p.463-478, 1994.

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. et al. *Leptospira* and Leptospirosis. Austrália: Medsci, p. 272, 2000.

FAINE, S. et al. *Leptospira* and Leptospirosis. Edition Melbourne, Australia.1999.

FONTAINE, A. G. et al. Comparison of the efficacy of three commercial bacterins in preventing canine leptospirosis. *Vet. Rec.* n.6, p.165-169, 2003.

FREIRE I. M. A., et al. Níveis séricos de ureia e creatinina em cães com leptospirose aguda determinada por amostras do sorogrupo *Icterohaemorrhagia*. *Ciência Rural Santa Maria.* n.38, v.4, p.1172-1175, 2008.

GABRIEL, A. M. et al. The detection and characterization of pathogenic *Leptospira* and the use of OMPs as potential antigens and immunogens. *Trop. Biomed.* n.23, p.194-207, 2006.

GOLDSTEIN R. E. Canine Leptospirosis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice.* n.40, p.1091-1101, 2010.

GREENE, C. E. *Infectious diseases of the dog and cat.* Athens: Saunders. p 934, 2006.

GREENLEE, J. J. et al. Experimental canine leptospirosis caused by *Leptospira interrogans* serovars *Pomona* and *Bratislava*. *American Journal of Veterinary Research,* v. 66, p. 1816-1822, 2005.

GUIDUGLI F. Prevenção e tratamento da leptospirosis: revisão sistemática de ensaios clínicos aleatórios com metanálises. São Paulo, SP. Tese Doutorado - Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina, 2000.

HAAKE, D. A. et al. Characterization of the leptospiral outer membrane and description of three novel leptospiral membrane proteins. *Infect Immun.* n. 70, p. 4936-4945, 2002.

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

HAGIWARA, M.K.et al. Leptospirose canina. Vet News, v.11, p.7-8, 2004.

IBARRA, C.; ESPINOZA, C.; CORNEJO, R. Enfermedad de weil, presentación de un caso clínico. Clin. Cienc., v.1, p.25-32, 2003.

JASZCZERSKI D. C. F. C. Cinética da resposta imune humoral em cães imunizados com *Leptospira interrogans* sorovares *icterohaemorrhagiae*, *canicola*, *pomona* e *grippotyphosa*. Dissertação de Mestrado em Patologia, Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. p.82, 2005.

JOUGLARD, S.D.D.; BROD, C.S. Leptospirose em cães: prevalência e fatores de risco no meio rural do município de Pelotas, RS. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v.67, n.2, p.181-185, 2000.

LANGONI H. et al. Avaliação da dinâmica de anticorpos pós-vacinais contra *Leptospira* spp. em cães vacinados pela prova de SAM. Ars Vet. v.18, p.54-61, 2002.

LANGONI, H. et al. Prevalência de anticorpos anti-toxoplasma gondii com cães, no município de Botucatu/SP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIA, n.27, p.24. Águas de Lindóia, 2000.

LANGSTON C. E., et al. Leptospirosis: a re-emerging zoonotic disease. Vet. Clin. Small Anim. V.33, p. 791-807, 2003.

LEFEBVRE, R. B. Leptospiras. In: HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. Microbiologia Veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.174-178, 2003.

LEMOS, J. P.; MELO, C. B.; VIEGAS, S. A. R. A. Análise sorológica de *Leptospiras* ssp. em cães errantes no município de Aracaju. São Paulo, n. 14, Jan. 2010.

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

MACHRY, L. et al. Caracterização de cepas de referência de *Leptospira* sp. utilizando a técnica de pulsed field gel electrophoresis. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 43, n. 2, 2010.

MAGALHÃES D. F. et al. Prevalência de aglutininas anti-*Leptospira interrogans* em cães de Belo Horizonte, Minas Gerais, 2001 a 2002. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. p.167-174, 2006.

MANUAL DE ZOONOSES. Programa de Zoonoses Região Sul. 2011. Disponível em:

<http://www.zoonoses.org.br/absoluto/midia/imagens/zoonoses/arquivos_1258562903/1629_crmv-pr_manual-zoonoses_leptospirose.pdf> Acesso em jun. 2016.

MARINHO M. Leptospirose: Fatores epidemiológicos, fisiopatológicos e imunopatogênicos. Vet. Zootec. n.15, p.428-434, 2008.

MASTRORILLI, C., DONDI, F., AGNOLI, C. et al. Clinicopathologic features and outcome predictors of *Leptospira interrogans* Australis serogroup infection in dogs: a retrospective study of 20 cases (2001-2004). Journal of Veterinary Internal Medicine. v. 21, p. 2-10, 2007.

MATSUNAGA, J. et al. Response of *Leptospira interrogans* to Physiologic Osmolarity: Relevance in Signaling the Environment-to-Host Transition, Infection and Immunity. v.75, n.6, p.2864-2874, 2007.

MATTHIAS, M.A. et al. Human leptospirosis caused by a new, antigenically unique *Leptospira* associated with a *Rattus* species reservoir in the Peruvian Amazon. PLoS Neglect. Trop. v. 2. p.213, 2008.

MONTEIRO G.R.G. Efetividade da doxiciclina na profilaxia contra Leptospirose. Dissertação de Mestrado em Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, RN. 61p, 2003.

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

NAIMAN, B. M. et al. Protective killed *Leptospira borgpetersenii* vaccine induces potent Th1 immunity comprising responses by CD4 and gammadelta T lymphocytes. Infect. Immun. n. 69, v.12, p.7550-7558, 2001.

NALLY, J.E. et al. Alveolar septal deposition of immunoglobulin and complement parallels pulmonary hemorrhage in a guinea pig model of severe pulmonary leptospirosis. Am. J. Pathol. n.164, v.3, p.1115-1127, 2004.

NASCIMENTO, A. L. T. O. et al. Genome features of *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni. Braz. J. Med. Biol. Res., v. 37, n. 4, p. 459-477, 2004a.

NASCIMENTO, A. L. T. O. et al. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. Journal of Bacteriology, Washignton D. C., v.186, n.7, p.2164-2172, 2004(b).

NELSON, R.W., COUTO, C. G.; Medicina interna de pequenos animais. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 1222-1224, 2006.

NOEL, R., LAMITER, K.S. An overview of canine leptospirosis, acesso em. <Disponível em <http://www.vet.uga.edu/vpp/clerk/noel>> acesso em mar. 2016.

OLIVEIRA S. J., PIRES NETO J. A. S. Aspectos etiológicos e de diagnóstico nas leptospiroses. Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária e Zootecnia. n.33, p.36-46, 2004.

OLIVEIRA, S. T. Leptospirose canina: dados clínicos, laboratoriais e terapêuticos em cães naturalmente infectados. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

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, dez., 2011.

PICARDEAL, M. et al. Genome Sequence of the Saprophyte *Leptospira biflexa* Provides Insights into the Evolution of *Leptospira* and the Pathogenesis of Leptospirosis. v.3, p.1607, 2008.

PREFEITURA DE CRUZ DAS ALMAS. Histórico de cruz das almas. Disponível em <<http://www.cruzdascalmas.ba.gov.br/cidade>> Acesso em jun. 2016.

QUERINO, A. M. V. et al. Fatores de risco associados à leptospirose em cães do município de Londrina-PR. Ciências Agrárias, v.24, n.1, p.27-34, 2003.

QUINN, P. J et al. Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas. Porto Alegre, Artemed, p.179-183, 2005.

REICHMANN, M.L.A.B., et al. Vacinação contra raiva de cães e gatos. São Paulo: Instituto Pasteur. V. 3, p.11-12, 1999.

RISTOW, P. et al. Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. Microbiology n.154,p.1309-1317, 2008.

RUBEL. D. et al. *Leptospira interrogans* em uma população canina da grande Buenos Aires; variáveis associadas com a soropositividade. Panamericana Salud Pública, v.2, n.2, p.102-5, 2005.

SANTIM, K. et al. Pesquisa de aglutininas anti-*Leptospira* em cães clinicamente saudáveis e em cães com suspeita clínica de leptospirose. Clínica Veterinária, n.60, p. 48-52, janeiro/fevereiro, 2006.

SCHRÖPPEL, B.; HE, J. C. Expression of Toll-like receptors in the kidney: their potential role beyond infection. *Kidney International*, New York, v.69, n.5, p.785-787, 2006.

SEIXAS, F. K. et al. Evaluation of different ways of presenting LipL32 to the immune system with the aim of developing a recombinant vaccine against leptospirosis. *Can J Microbiol.*, n.53, p.472-479, 2007.

SENTHILKUMAR, T. M. A. et al. Rapid serodiagnosis of leptospirosis by latex agglutination test and flow-through assay. *Ind. J. Med. Microbiol.* n.26, v.1, p.45-49, 2008.

SESSIONS, J. K.; GREENE C. E. Canine leptospirosis: treatment, prevention, and zoonosis. *Compendium on Continuing Education for the Practising veterinarian*, v.26, p.700-711, 2004.

SILVA, E. F. et al. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. *Vaccine*, n.25, p.6277-6286, 2009.

SLIFKA, M. K., WHITTON, J. L. Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J. Mol. Med.* n.78. p.74-80, 2000.

SOBESTIANSKY J, et al. *Clínica e patologia suína*. 2ª ed. Goiânia: Universidade Federal de Goiás. p.464, 1999.

SYKES, J. E. et al. 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. et al. Sorologia negativa e PCR positiva: a importância da biologia molecular para o diagnóstico de leptospirose aguda em um cão. *Clínica Veterinária*, n.73, p.44-48, março/abril, 2008.

TESSEROLLI, G. L. et al. Principais sorovares de leptospirose canina em Curitiba, Paraná. *PUBVET*, v.2, n.21, Maio, 2008.

TEXEIRA, M, A. et al. Sorologia negativa e PCR positiva: a importância da biologia molecular para o diagnóstico de leptospirose aguda em um cão. *Clínica Veterinária*, Ano XIII, n. 73, 2008.

TILLEY, L. P.; SMITH, F. W. K. *Consulta veterinária em 5 minutos, espécie canina e felina*. 2.ed. São Paulo: Manole, 2003.

VASCONCELOS, C. H. et al. Fatores ambientais e socioeconômicos relacionados à distribuição de casos de leptospirose no Estado de Pernambuco, Brasil, 2001–2009. *Caderno de Saúde Coletiva*, n.20, p.49-56, 2012.

VEDHAGIRI, K. Characterization of *leptospira borgpetersenii* isolates from field rats (*rattus norvegicus*) by 16s rna and *lipl32* gene sequencing. *Brazilian Journal of Microbiology*, n.41, p.150-157, 2010.

VERONESI, R.; FOCACCIA, R. Tratado de infectologia. São Paulo. Atheneu.v. 2, p.987-1003, 2002.

VIJAYACHARI, P.; SUGUNAN, A.P.;SHRIRAM, A.N. Leptospirosis: an emerging global public health problem. *J. Biosci.* n.33, p.557-569. Nov, 2008.

WARD, M.P. Seasonality of canine leptospirosis in the United States and Canada and its association with rainfall. *Preventive Veterinary Medicine.* v.56, p.203–213, 2002.

WOHL, J.S. Canine Leptospirosis. *Revista Compendium.* V.18. n.11. p.1215-225. Novembro, 1996.

YANG, H.L. et al. Thrombocytopenia in the experimental leptospirosis of guinea pig is not related to disseminated intravascular coagulation. *BMC Infect. Dis.* n.2, v.6, p.19-27, 2001.

YASUDA, P. H. et. al. Variação sazonal na prevalência de leptospirose em cães de rua na cidade de São Paulo, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v.14 (4), p.589-596, 1980.

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:

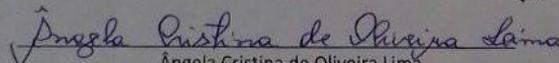
FINALIDADE	() Ensino (X) Pesquisa Científica
VIGÊNCIA DA AUTORIZAÇÃO	25/04/2016 a 31/07/2016
ESPÉCIE/LINHAGEM/RAÇA	Cães SRD
Nº DE ANIMAIS	200
PESO / IDADE	4 a 40Kg/ 3 meses a 12 anos
SEXO	Ambos os sexos
ORIGEM	Cães da cidade de Cruz das Almas

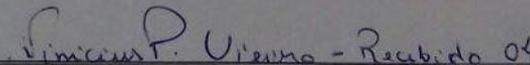
De acordo com a Resolução Normativa N°1 de 09 de julho de 2010, no capítulo II, Artigo 6°, do CONCEA, solicitamos que no final do projeto, seja entregue a CEUA uma cópia do relatório final.

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


 Simão P. Vieira - Recbido 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 Rui 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**FICHA CLÍNICA**

DATA DA COLETA: __/__/__

N° DA AMOSTRA:

1. IDENTIFICAÇÃO:

Nome: _____ Telefone: _____

Idade: _____ Raça: _____ Sexo: () M () F

Proprietário: _____

Endereço: _____

DADOS CLÍNICOS

1. Frequência cardíaca: _____

2. Frequência respiratória: _____

3. Temperatura: _____

4. TPC: _____

5. Mucosas: _____

6. Ninfonodos: _____

7. Hidratação: _____

8. Comportamento: _____

9. Presença de:

- () Anorexia () Êmese () Algia à palpação abdominal () Icterícia () Ceratoconjutivite
() Petéquias () Hematúria () Hematoquezia () Epistaxe () Escleras hiperêmicas