

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JULIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**  
**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM *Leptospira interrogans***  
**SOROVARIEDADE CANICOLA, RELACIONADA À PESQUISA**  
**DE ALTERAÇÕES OCULARES EM CÃES**

**Michelle Brich**  
**Médica Veterinária**

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL**  
**AGOSTO DE 2010**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**  
**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM *Leptospira interrogans***  
**SOROVARIEDADE CANICOLA, RELACIONADA À PESQUISA**  
**DE ALTERAÇÕES OCULARES EM CÃES**

**Orientada: Michelle Brich**

**Orientador: Prof. Dr. Raul José Silva Girio**

**Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do Título de Mestre em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva)**

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL**  
**AGOSTO DE 2010**

Brich, Michelle  
B849i Infecção Experimental com *Leptospira interrogans* sorovariedade  
Canicola, relacionada à pesquisa de alterações oculares em cães /  
Michelle Brich. -- Jaboticabal, 2010  
xii, 39 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010  
Orientador: Raul José Silva Girio  
Banca examinadora: Luís Antônio Mathias, Heloisa Cristina da  
Silva  
Bibliografia

1. Leptospira. 2. cães. 3. Uveíte. 4. Alterações oculares I. Título. II.  
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.988.7:636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

**MICHELLE BRICH** – nascida em 03 de fevereiro de 1980, em Ribeirão Preto – São Paulo, é Médica Veterinária formada pela Universidade de Franca – UNIFRAN, em dezembro de 2005. Mestranda do curso de pós graduação em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, durante o período de 2008 à 2010.

DEDICO A DEUS EM PRIMEIRO LUGAR, pela oportunidade e por ter aberto as portas para a realização deste trabalho.

A meus pais, Luiz e Maria Luiza, que desde sempre inculcaram-me os valores e princípios éticos e morais dos quais jamais me afastei.

A meus irmãos, Guto e Tati, pelo companheirismo de sempre.

## AGRADECIMENTOS

Meu agradecimento especial ao Prof. Dr. Raul José Silva Girio, pela orientação e oportunidade dada, e por ter acreditado em mim.

Ao Prof. Dr. Luis Antonio Mathias, por ser sempre correto e justo, ajudando-me e orientando-me sempre que precisei, com muita sabedoria; mesmo nos momentos em que sua mesa de trabalho estava repleta.

Ao nosso querido amigo Nivaldo Aparecido Assis, que sempre esteve disposto a ensinar e ajudar em todas as análises feitas, sempre de bom humor e calmo.

À Dra. Fernanda Magajevski, por estar sempre ali disposta a me ajudar e me orientar em toda minha caminhada, e pela amizade especial que nasceu a partir daí. Muito obrigada, amiga.

À amiga Raphaella Meireles, por, desde o começo, ter me incentivando a continuar, por toda ajuda em todos os momentos e por tudo que vivemos juntas.

Ao amigo Lucas Santana, por também ter participado do experimento, estando sempre junto nas colheitas e nos exames laboratoriais.

Ao Dr. Halim Atique Netto e à Unirp, pela ajuda na colheita das amostras e manutenção dos animais.

À Poliana, por ter me ensinado a técnica de PCR, e pelo companheirismo.

A todos os professores do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, sempre estiveram ali, pra que eu pudesse tirar as minhas mais variadas dúvidas.

Aos prestativos técnicos do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, sempre dispostos a ajudar.

A todos os estudantes de pós-graduação que de uma forma ou de outra sempre compartilharam vários momentos e aulas neste período.

Ao Instituto Biológico de São Paulo, pela realização dos exames de PCR, e aos técnicos que os fizeram.

A todos os quais eu não citei e que ajudaram na realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

Lista de tabelas.....	ix
Lista de quadros .....	x
RESUMO .....	xi
SUMMARY .....	xii
1.INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA .....	01
2.OBJETIVOS.....	11
3.MATERIAL E MÉTODOS .....	12
3.1 Instalação e manejo dos cães.....	12
3.2 Seleção dos animais.....	12
3.3 Inoculação .....	13
3.4 Exame oftálmico .....	13
3.5 Colheita das amostras .....	14
3.5.1 Sangue.....	14
3.5.2 Humor aquoso e globo ocular .....	14
3.6 Eutanásia dos animais.....	14
3.7 Pesquisa de anticorpos.....	15
3.7.1 Preparo dos antígenos de leptospira .....	15
3.7.2 Técnica de Soroaglutinação Microscópica .....	15
3.8 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) .....	16
3.8.1 Extração de DNA .....	16
3.8.2 Oligonucleotídeos iniciadores empregados na amplificação.....	18
3.8.3 Amplificação do DNA bacteriano .....	18
3.8.4 Ciclo de amplificação .....	19
3.8.5 Análise do produto amplificado .....	19
3.9 Técnica de Levaditi .....	20
3.10 Histopatológico .....	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	22
5. CONCLUSÕES.....	27
6. REFERÊNCIAS .....	28



**LISTA DE TABELAS**

Página

1. Títulos de anticorpos aglutinantes encontrados em quatro avaliações nos cinco cães inoculados com a cepa LO4 de *Leptospira interrogans* sorovariedade Canicola pelo período de sete dias, representando o Grupo G1 do presente experimento. Jaboticabal, São Paulo, 2009.....22
2. Títulos de anticorpos aglutinantes encontrados em seis avaliações nos cinco cães inoculados com a cepa LO4 de *Leptospira interrogans* sorovariedade Canicola pelo período de 15 dias, representando o Grupo G2 do presente experimento. Jaboticabal, São Paulo, 2009.....22
3. Títulos de anticorpos aglutinantes encontrados em nove avaliações nos cinco cães inoculados com a cepa LO4 de *Leptospira interrogans* sorovariedade Canicola pelo período de 30 dias, representando o Grupo G3 do presente experimento. Jaboticabal, São Paulo, 2009.....23
4. Títulos de anticorpos aglutinantes encontrados em 12 avaliações nos cinco cães inoculados com a cepa LO4 de *Leptospira interrogans* sorovariedade Canicola pelo período de 45 dias, representando o Grupo G4 do presente experimento. Jaboticabal, São Paulo, 2009.....23

**LISTA DE QUADROS**

Página

1. Estirpes de *Leptospira interrogans* empregadas como antígeno na reação de soroaglutinação microscópica aplicada à leptospirose, segundo o número de controle (código), o sorogrupo e a variante sorológica.....16
2. Sequência dos pares de base dos dois primers utilizados no experimento.....18

## INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM *Leptospira interrogans* SOROVARIEDADE CANICOLA, RELACIONADA À PESQUISA DE ALTERAÇÕES OCULARES EM CÃES

**RESUMO-** A uveíte em mamíferos tem sido relacionada à infecção por *Leptospira* spp., e, embora ocorra com maior frequência na espécie equina, já foi observada e relatada em outras espécies mamíferas, inclusive na humana. O objetivo deste trabalho foi investigar a relação entre a infecção por leptospiros e a ocorrência de alterações oculares em cães. Para a obtenção dos dados foram utilizados 32 cães, em idade reprodutiva, recolhidos pelo Centro de Controle de Zoonoses do Município de São José do Rio Preto, que apresentaram reação negativa, em duas provas de soroaglutinação microscópica (SAM) no intervalo de sete dias. Dos 32 cães, 20 foram inoculados com uma cepa patogênica de *Leptospira interrogans* sorovariedade Canicola e 12 formaram o grupo controle. Com a finalidade de avaliar as possíveis alterações do globo ocular *post mortem*, oito cães (cinco inoculados e três controles) foram sacrificados nos dias: sete, 15, 30 e 45 após o dia da inoculação. Amostras de humor aquoso, de um dos olhos de cada animal, foram retiradas para realização de PCR e SAM; o outro globo ocular foi retirado para realização de exame histopatológico e para a técnica de coloração de Levaditi. Nos dias zero, três, cinco, sete, 10 e após, a cada cinco dias, inclusive no dia do sacrifício, foram realizadas avaliações do estado físico do animal, do globo ocular e realizadas colheitas de sangue. O soro sanguíneo foi submetido à SAM para estabelecer os títulos obtidos em cada fase da infecção. Embora todos os animais tenham apresentado títulos sorológicos, indicando o sucesso da infecção, nenhum dos testes de detecção resultou positivo em até 45 dias de observação; no exame clínico apenas três animais apresentaram alterações perceptíveis: dois apresentavam irritação ocular, com hiperemia da esclera e um animal apresentava lacrimejamento. Assim, conclui-se que 45 dias de infecção por *Leptospira interrogans* sorovariedade Canicola não são suficientes para causar danos sérios ao sistema ocular de cães.

**Palavras Chave:** Leptospira, Cães, Uveíte, Alterações oculares.

**SUMMARY** - Uveitis in mammals has been related to *Leptospira* spp. And although it occurs more frequently in the horse has already been observed and reported in other mammalian species, including the human. The aim of this study was to investigate the relationship between leptospira infection and the occurrence of ocular changes in dogs. To obtain the data were used 32 dogs in the reproductive age, collected by the Center for Zoonosis Control in São José do Rio Preto, which showed negative reaction in both tests of microscopic agglutination test (MAT) within seven days. Of the 32 dogs, 20 were inoculated with a pathogenic strain of *Leptospira interrogans* sorovar Canicola and 12 formed the control group. With the aim of assessing possible changes of the eye post mortem, eight dogs (five inoculated and three controls) were sacrificed on days: seven, 15, 30 and 45 days after inoculation. Samples of aqueous humor of one eye of each animal were removed for PCR, and MAT, and the other eye was removed for histological examination and the staining technique Levaditi. On days zero, three, five, seven, 10 and, thereafter, every five days, including the day of sacrifice, were assessed the physical condition of the animal, the eyeball and blood samples. The serum was subjected to SAM to establish the qualifications obtained at each stage of infection. Although all animals have serologic evidence indicating the success of infection, no detection tests resulted positive in up to 45 days of observation and by clinical examination only three animals showed noticeable changes: two had eye irritation with redness of the sclera and one animal showed tearing. We conclude that 45 days of infection with *Leptospira interrogans* sorovar Canicola are not enough to cause serious damage to the ocular system of dogs.

Keywords: Leptospira, Dogs, Uveitis, Ocular.

## 1- INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

As leptospiros são espiroquetas pertencentes à ordem *Spirochaetales*, família *Leptospiraceae*, gênero *Leptospira* (NOGUCHI, 1918). O gênero *Leptospira* era anteriormente dividido em duas espécies: *Leptospira interrogans*, apresentando uma variação antigênica caracterizada por 23 sorogrupos e 202 sorotipos (BARATON & POSTIC, 1989), que englobava um grande número de variedades antigênicas, e *Leptospira biflexa*, variedades de comportamento saprófita de vida livre presentes em água doce de superfície, distribuídas em 38 sorogrupos e 65 sorotipos (FAINE, 1999). Essa divisão baseava-se em critérios estritamente relacionados a reações sorológicas relativamente específicas, que forneciam os sorogrupos e as sorovariedades de leptospiros patogênicos e saprófitas. A identificação dos sorotipos só era possível pelo emprego da técnica de absorção cruzada de aglutininas, executada por laboratórios de referência (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1985). Recentemente, na reunião do Subcomitê de Taxonomia da Leptospiraceae realizada no Equador, em 2007, a *L. interrogans* foi reclassificada em 13 espécies patogênicas: *L. alexanderi*, *L. alstonii*, *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. fainei*, *L. kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. terpstrae*, *L. weilii*, *L. wolffii*, distribuídas em mais de 260 sorovariedades agrupadas em 23 sorogrupos (ADLER & MOCTEZUMA, 2009).

As diferentes sorovariedades de *L. interrogans* não apresentam especificidade de hospedeiro, porém o que se observa é a existência de uma preferência de certas sorovariedades por determinados vertebrados. Exemplo dessa condição configura-se na associação estabelecida entre o cão doméstico e a sorovariedade Canicola (QUINN et al., 1994; FAINE, 1999).

A patogenia da leptospirose inclui a penetração do microrganismo nas mucosas, entre elas a ocular, ou na pele lesionada ou íntegra, seguida de multiplicação no sangue e em praticamente todos os órgãos e tecidos, o que caracteriza a fase denominada leptospiremia, na qual há o comprometimento do fígado, dos rins, dos pulmões, das adrenais, do cérebro, do globo ocular, do útero, do ovário, e da glândula mamária (FAINE, 1982; FAINE, 1999).

Durante o período de incubação, de sete a 14 dias, ocorre a septicemia, surgindo a produção de anticorpos da classe IgM, que tem uma atividade de poucos dias, e surgem mais tardiamente anticorpos da classe IgG. Apesar de os anticorpos ajudarem no combate à bacteremia, não eliminam por si só a infecção renal (REBHUN, 1995). Nos animais que conseguem sobreviver à fase aguda da leptospirose, os microrganismos atingem a luz dos túbulos contornados renais e passam a ser eliminados por meio da urina por períodos de tempo variados, caracterizando a fase de leptospirúria; com isso, os animais tornam-se uma fonte de infecção importante, sendo denominados portadores renais (VASCONCELLOS, 1987).

A transmissão da *Leptospira* spp. pode ocorrer de forma indireta, pelo contato com água e solos contaminados, e pelo modo direto (AMATREDJO et al., 1975). Uma vez infectados, os animais podem eliminar o agente na urina por um período de tempo variável, que pode chegar a mais de um ano (HANSON, 1982; THIERMANN, 1984). Originalmente os carnívoros não representavam uma fonte de infecção importante para o homem, uma vez que a alimentação à base de carnes propicia uma urina com o pH mais ácido, o que representa um ambiente inóspito para as leptospirosas, mas no caso dos cães domésticos, alimentados com rações comerciais, o pH da urina torna-se apropriado para a manutenção e sobrevivência dessas bactérias. Há alguns anos a leptospirose canina vem sendo considerada um sério problema sanitário, não só pela sua gravidade mas principalmente como um elemento potencial para o contágio do homem, devido à estreita relação estabelecida entre seres humanos e cães (ACHA & SZYFRES, 2001).

Lobo et al. (2003 e 2007), no Município de Santa Cruz do Sul, RS, levantaram a hipótese de que os animais domésticos são importantes veiculadores, já que as coletas foram realizadas especificamente em locais em que foram notificados casos de infecção humana por leptospirose

Agelas et al. (2005) descreveram 16 casos de leptospirose humana no Hospital de Saint-Denis na França entre os anos de 2001 e 2004, dos quais 66% causados pelas sorovariedades Canícola e 17% pelas sorovariedades Icterohaemorrhagiae e Sejroe.

Os cães foram os primeiros animais domésticos nos quais se investigou a leptospirose, estando normalmente relacionada com nefrite intersticial, e como consequência dos danos renais, normalmente, observa-se proteinúria. O quadro clínico normalmente evolui para icterícia e manifestações urêmicas. A sorovariedade Canicola é a responsável por desencadear um quadro de nefrite intersticial aguda e gastroenterite com maior envolvimento renal, sendo conhecido como enfermidade de Stuttgart ou tifo canino (BEER, 1988; ZARAGOZA et al., 2003). GIRIO (1993) relatou que também fazem parte do quadro clínico, além de insuficiência renal e diarreia, sinais de enterite hemorrágica, emese, estado de coma e alta letalidade.

Vários trabalhos têm sido realizados no mundo sobre a ocorrência da leptospirose canina. RYU (1976), examinando, pelo teste de soroaglutinação microscópica (SAM), 14.709 soros de cães obtidos de várias partes do mundo, encontrou uma prevalência significativa das sorovariedades Icterohaemorrhagiae e Canicola.

Na Ilha de Trindade, oeste da Índia, EVERARD et al. (1979) investigaram a leptospirose em 96 cães, utilizando técnicas sorológicas, e constataram que 55% das amostras (53 cães) foram reagentes às sorovariedades Canicola, Copenhageni, Pyrogenes, Habdomalis, Tarassovi, Autumnalis e Grippytyphosa.

MYERS (1980), estudando amostras de soro de 143 cães, colhidas no município de Moreno, província de Buenos Aires, detectou que 73 animais (51%) entraram em contato com *Leptospira* spp., sendo a sorovariedade Canicola (37%) a mais encontrada.

Em Porto Rico, FARRINGTON & SULZER (1982) observaram soropositividade para leptospirose em 73 de 116 cães de rua (62,9%); destes, 53 (72,6%) foram reagentes à sorovariedade Icterohaemorrhagiae, sendo que a maior ocorrência foi verificada em cães machos (52%).

BRIHUEGA & HUTTER (1994) examinaram 624 amostras de soros sanguíneos de cães, com suspeita de leptospirose, no município de Buenos Aires, das quais 33,5% foram reagentes, principalmente às sorovariedades Canicola (52,2%) e Icterohaemorrhagiae (47,1%).

Altas porcentagens de cães reagentes para leptospirose também foram observadas na Índia por RATNAM et al. (1994) que, ao realizarem um estudo durante um surto, observaram que as taxas variaram de 16,3% a 54,5%, principalmente para as sorovariedades Canicola, Icterohaemorrhagiae e Pomona.

PINEDA et al. (1996), estudando uma população de 60 cães atendidos aleatoriamente na Universidade do Chile, identificaram as sorovariedades Canicola e Pyrogenes, com uma frequência de 17,4% e 13%, respectivamente.

Na Bolívia, CICERONI et al. (1997) estudaram 43 amostras de soro de cães que não apresentavam sinais clínicos de leptospirose e encontraram título 100 em 14% dos animais, predominando as sorovariedades Poi, Shemani, Pomona, Canicola, Javanesa e Djasiman, entre outras.

No município de Buenos Aires, RUBEL et al. (1997), ao pesquisarem anticorpos em amostras de soros de 223 cães (11,5% da população canina local naquele momento), encontraram uma prevalência de 57% de reagentes às sorovariedades Pyrogenes, Canicola e Icterohaemorrhagiae, entre outras.

Na ilha de Barbados, WEEKES et al. (1997) estudaram 139 amostras de soros sanguíneos de cães, sendo 78 de animais errantes sem sintomas aparentes e 61 com suspeita de leptospirose aguda. Verificaram nas amostras dos cães errantes que 62% foram reagentes, com títulos maiores ou iguais a 100, principalmente para as sorovariedades Autumnalis (45%), Icterohaemorrhagiae (16%), Australis (16%) e Pomona (13%). Nos cães que apresentavam sinais de leptospirose aguda, a ocorrência de reagentes foi de 75%, com maior frequência para as sorovariedades Icterohaemorrhagiae (36%) e Australis (13%).

Utilizando-se a técnica de SAM em 709 amostras sorológicas de cães com suspeita de leptospirose na cidade de Buenos Aires, ROSSETTI et al. (1999) verificaram que 389 amostras (55%) foram reagentes às sorovariedades Castellonis (33%) e Copenhageni (29%), sendo a maioria observada em cães machos e adultos.

A leptospirose canina também foi verificada como doença emergente na Polônia, quando SOBIECH (1999) encontrou 42,7% de cães reagentes para leptospirose em um total de 110 animais examinados. A sorovariedade Canicola foi detectada em 20,9% e a Icterohaemorrhagiae, em 5,5%.



Um estudo realizado por PRESCOTT et al. (2002) aponta a preocupação com o aumento acentuado no número de casos de leptospirose canina, a partir do ano de 1998, registrados no Hospital - Escola da Faculdade de Veterinária de Ontário.

No Hospital Veterinário da Universidade Chiang Mai, na Tailândia, foram selecionados aleatoriamente 210 cães para pesquisa da soroprevalência de leptospirose. Destes, 11% foram positivos, e as sorovariedades encontrados foram Bataviae (5,2%), Canicola (2,4%), Australis (1,4%), Icterohaemorrhagiae (1,4%), Ballum (0,5%), Djasiman (0,5%), Javanica (0,5%), Mini (0,5%) e Sejroe (0,5%) (MEEYAM et al., 2006).

Os estudos sobre a leptospirose canina no Brasil têm mostrado uma prevalência de 10 a 22% (CASTRO et al., 1962; CALDAS et al., 1976; ALVES et al., 2000; BLAZIUS et al., 2005).

Na Bahia, CALDAS et al. (1976) realizaram um inquérito sorológico em 430 cães, constatando 21,6% de positividade para *L. interrogans*, com prevalência das sorovariedades Canicola e Icterohaemorrhagiae, entre outras.

Na cidade de São Paulo, YASUDA et al. (1980) isolaram 35 cepas de leptospiras em cães errantes e, após tipificação dessas cepas, constataram que a sorovariedade Canicola foi a mais frequente (32/35).

Em um estudo sobre a frequência da leptospirose canina diagnosticada no atendimento de rotina do Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp - Câmpus de Jaboticabal, durante o período de 1986 a 1990, MORALES et al. (1990) observaram 88 cães reagentes na SAM, sendo a sorovariedade Canicola a mais frequentemente encontrada nas amostras de soro reagentes (51,2%), seguida pelas sorovariedades Icterohaemorrhagiae (40,9%), Pomona (4,5%) e Gryppothyphosa (3,4%).

Segundo SANTIN et al. (2006), os trabalhos realizados no Brasil sugerem que as sorovariedades Icterohaemorrhagiae e Canicola são as mais frequentemente encontradas em caninos no nosso meio.

LILENBAUM et al. (1994) encontraram, em um inquérito sorológico realizado com 745 amostras de cães do Rio de Janeiro, a predominância de Canicola (34,1%), Andamana (26,1%) e Icterohaemorrhagiae (21,9%).

No Rio Grande do Sul, FURTADO et al. (1997) examinaram 260 soros de cães da Cidade de Pelotas e encontraram uma prevalência de 28,9%, com predomínio das sorovariedades Canicola (49%) e Icterohaemorrhagiae (32%).

ALVES et al. (2000) encontraram 20% de reagentes em 114 cães da Cidade de Patos, PB, com destaque para as sorovariedades Autumnalis, Butembo, Grippytyphosa e Australis.

Em Pelotas, JOUGLARD & BROD (2000) verificaram 2,7% de positividade em 489 cães, com destaque para as sorovariedades Icterohaemorrhagiae, Australis, Copenhageni, Pyrogenes, Sentot e Canicola.

Em um inquérito sorológico para leptospirose canina, durante a campanha de vacinação em cães no Município de Santana do Parnaíba, Estado de São Paulo, MASCOLLI (2001) verificou uma frequência de aglutininas em torno de 15%, nos 410 animais examinados, sendo as sorovariedades Copenhageni (24%), Canicola (20%) e Hardjo (20%) as mais encontradas.

FAVERO et al. (2002) verificaram 17,9% (137/795) e 19,7% (37/187) de positividade, com predomínio das sorovariedades Copenhageni e Icterohaemorrhagiae, em cães nos Estados de São Paulo e Piauí, respectivamente.

Na cidade de Londrina, Estado do Paraná, QUERINO et al. (2003), examinando amostras de soros de 160 cães não vacinados contra a leptospirose, encontraram vários animais reagentes às sorovariedades Pyrogenes (45%), Icterohaemorrhagiae (40%), Copenhageni (22,5%), Bataviae (22,5%), Bratislava (17,5%), Autumnallis (15%) e Grippytyphosa (15%).

A maior incidência das sorovariedades citadas anteriormente já havia sido observada em um estudo epidemiológico realizado na cidade de São Paulo, quando HAGIWARA E SANTA ROSA (1980), visando correlacionar a leptospirose canina com problemas hepáticos e renais, estudaram dois grupos de cães: um de 10 animais com sintomas da doença, e outro de 22 cães com insuficiência hepática e renal. Concluíram

que 60% dos casos suspeitos foram reagentes, sendo as sorovariedades Icterohaemorrhagiae e Canicola as mais frequentes. Entre os animais com insuficiência hepática ou renal 36,3% foram reagentes a pelo menos uma dessas sorovariedades.

A prova de SAM é o teste sorológico mais utilizado para o diagnóstico da leptospirose bovina (BOLIN et al., 1989) no Brasil e em todo o mundo (OLIVEIRA, 1999). THIERMANN (1984) ressalta que, apesar da padronização desse teste, há dificuldade de obter resultados concordantes entre os diferentes laboratórios. É uma técnica laboriosa e exige o uso de leptospiras vivas como antígenos (CHAPPEL et al., 1998).

O diagnóstico definitivo da infecção por *Leptospira* spp. é usualmente dado pelo isolamento e cultivo do agente, entretanto esse procedimento é oneroso, necessita de amostras recém-colhidas, e pelo menos 30 dias são requeridos para a obtenção de resultados conclusivos (BOLIN et al., 1989).

A PCR, importante técnica de detecção de material genético, inclusive de agentes patogênicos como algumas bactérias, é um método rápido e extremamente sensível, podendo teoricamente detectar uma única molécula de DNA em poucas horas. Outra grande vantagem da técnica de PCR decorre do fato de não ser necessária a viabilidade dos patógenos para a realização do teste, o que permite a inativação e o armazenamento das amostras, bem como a aplicação da técnica em amostras mal conservadas (GILLESPIE, 1990; GINGERAS et al., 1990; PAUL, 1990).

MÉRIEN et al. (1992) sintetizaram o par de oligonucleotídeos iniciadores Lep 1 e Lep 2 a partir da sequência do gene 16S rRNA de *L. interrogans* sorovariedade Canicola determinada por FUKUNAGA et al. (1990). A técnica de PCR, quando utilizada com esse par de oligonucleotídeos iniciadores, revelou ser específica para *Leptospira* spp, não amplificando o DNA de outras bactérias como *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia hermsii*, *Treponema denticola*, *Treponema pallidum*, entre outras. HEINEMANN (2000) demonstrou que os oligonucleotídeos iniciadores sintetizados por MÉRIEN et al. (1992) foram capazes de amplificar um fragmento de 330 pares de base (bp) a partir do DNA de todas as 30 sorovariedades de *Leptospira* spp. testados em seu trabalho, independentemente de serem apatogênicas ou patogênicas, devido provavelmente ao fato de os genes de rRNA serem altamente conservados entre as bactérias.

Em um estudo com 123 cães com sintomas sugestivos de leptospirose e 13 animais clinicamente saudáveis, concluiu-se que a PCR, para detecção de leptospira na urina de cães, teve 100% de sensibilidade e 88,3% de especificidade, sendo considerada uma arma no diagnóstico precoce de leptospirose (HARKIN et al., 2003). No mesmo trabalho, os autores utilizaram a técnica de cultura bacteriológica para detecção de leptospirúria, e o teste sorológico para detecção de anticorpos no sangue e afirmaram que, independentemente do estado de saúde, 8,2% dos cães eliminavam leptospirosas patogênicas na urina, representando um risco para seus proprietários. Eles também concluíram que o teste sorológico é um indicativo pobre, em termos de diagnóstico precoce, da eliminação de leptospirosas pela urina.

A técnica de PCR vem sendo utilizada com sucesso em vários estudos relacionados com leptospirose. FABER et al. (2000) puderam detectar DNA de leptospira em humor aquoso de equinos com uveíte recorrente.

A uveíte tem sido amplamente estudada em equinos com leptospirose. Embora existam poucos relatos e pesquisas sobre esse assunto, as leptospirosas também podem provocar uveíte em cães, como observado por TOWNSEND et al. (2006), que descreveram a ocorrência de panuveíte como resultado de uma infecção por leptospira em um terrier de oito anos de idade.

A úvea tem como principal função o fornecimento das necessidades metabólicas do olho; a íris regula a quantidade de luz que atinge a retina, e o corpo ciliar produz o humor aquoso que preenche a câmara anterior do olho e regula o processo de acomodação do cristalino (STADES et al., 1999). Normalmente, na uveíte, está associado o envolvimento secundário da córnea, da câmara anterior, da retina, do cristalino, do corpo vítreo e do nervo óptico (WHITLEY et al., 1993; DWYER et al., 1995). Os sinais clínicos da uveíte incluem epífora, blefarospasmo, fotofobia, edema corneano, hiperemia conjuntival e injeção ciliar. O “flare”, que é a reflexão de luz de partículas proteicas no humor aquoso, a presença de fibrina, hifema e hipópio (presença de sangue e de células inflamatórias, respectivamente, na câmara anterior) também podem estar presentes (MILLER & WHITLEY, 1987; SILLERUD et al., 1987; ABRAMS & BROONKS, 1990). Lesões peripapilares, focais e inativas, de coriorretinite crônica com

degeneração retiniana também podem ser identificadas em equinos com URE (GELATT, 1991) e são geralmente associadas a uveítes crônicas.

A uveíte pode estar associada a traumas penetrantes ou não, com ou sem contaminação, neoplasias intraoculares, doenças corneanas ou esclerais, particularmente as úlceras de córnea e um grande número de doenças sistêmicas e parasitárias (BISTNER, 1984; HINES, 1984; BARNETT, 1987; SILLERUD et al. 1987; MILLER & WHITLEY, 1987; ABRAMS & BROONKS, 1990; GELATT, 1991; SCHWINK, 1992; WHITLEY et al., 1993; DWYER et al., 1995).

No processo sistêmico associado a septicemia, viremia, endotoxemia, exotoxemia, a formação de imunocomplexos ou outra forma de antigenemia pode desencadear um quadro de uveíte. Entre os organismos patogênicos implicados como potenciais causadores de uveíte recorrente equina, a infecção persistente por *Leptospira* spp. patogênica seria a mais provável causa primária (FABER et al., 2000; HARTSKEERL et al., 2004), talvez pelo fato de algumas estruturas do globo ocular possuírem antígenos em comum com estas espiroquetas.

A patogênese da uveíte é complexa, envolve uma lesão tecidual inicial com rompimento da barreira sangue-humor aquoso a partir da qual instaura-se uma série de eventos capazes de induzirem episódios recorrentes da doença. Os fatores que levam à persistência ou recorrência da uveíte são múltiplos e incluem a localização de imunócitos competentes (linfócitos B) nos tecidos oculares e subsequente exposição ao mesmo antígeno ou similar, persistência do agente causador, deposição de complexo antígeno-anticorpo, alterações dos próprios antígenos causando uma inflamação autoimune e permanente desarranjo da vascularização uveal (GELATT, 1991).

Na uveíte ocorre quebra da barreira natural entre sangue e olho, o que pode resultar em presença de células e proteínas, além de alterações químicas e bioquímicas, na câmara anterior. O humor aquoso que preenche esta câmara sofreria alterações que poderiam se tornar crônicas devido aos episódios repetidos de inflamação da úvea. Essas alterações dependem da duração e da severidade dos episódios agudos e da recidivância destes (SILLERUD et al., 1987; DWYER et al., 1995). A cegueira normalmente é consequência final de muitos episódios recorrentes de uveíte que culminam em lesões graves e permanentes das estruturas do globo ocular.

O humor aquoso é produzido no corpo ciliar, onde os vasos são altamente fenestrados, deixando “fluir” a maior parte de seus componentes plasmáticos para dentro do estroma. Uma camada epitelial dupla que recobre os processos ciliares do corpo ciliar forma uma barreira entre o sangue e o humor aquoso, que controla o fluxo de fluido que penetra na câmara posterior. Essa barreira impede quase toda movimentação de proteínas e é efetiva contra solutos de baixo peso molecular, permitindo a passagem de poucas proteínas por pinocitose e outras aberturas no restante da úvea anterior (GELATT, 1991). A difusão de solutos por esta barreira é possível, sendo a produção do humor aquoso através de três processos: difusão, ultra-filtração e transporte ativo. Ainda segundo o mesmo autor, os níveis de substâncias no sangue afetam os níveis destas mesmas substâncias no humor aquoso, e a barreira sangue-humor aquoso permite a passagem livre de algumas substâncias do humor aquoso para tecidos adjacentes e sangue circulante. A quebra dessa barreira é visualizada clinicamente como um “flare”, e essa quebra resulta em modificações da composição do humor aquoso (GELATT, 1991).

De acordo com SWENSON (1984), o humor aquoso normalmente se apresenta como um líquido transparente que preenche a câmara anterior do olho e é produzido por filtração através de capilares fenestrados dos processos ciliares e pela secreção de solutos acompanhados por água, através do epitélio ciliar. À medida que os produtos de excreção são eliminados dos tecidos adjacentes para o humor aquoso, sua composição altera-se, enquanto flui da câmara posterior, onde é formado, para a câmara anterior, de onde é drenado para o sangue venoso uveal. Segundo GELATT (1991), o humor aquoso é semelhante a um “ultra filtrado” do plasma, e têm como função levar nutrientes até a córnea e a lente, que são estruturas avasculares, além de remover seus produtos de excreção e também preencher espaços, mantendo o formato e a turgidez do globo ocular.

A realização deste trabalho se baseou na preocupação com a ocorrência de uveítes de causa desconhecida nos cães e no fato de já ter sido relatado pelo menos um caso clínico em que se observou correlação entre a uveíte em cães e a infecção por leptospira.

## 2 - OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivos:

- 1 Relacionar uveíte em cães com a infecção experimental por leptospira.
- 2 Estudar as alterações anatomopatológicas (*post mortem*) e os aspectos clínicos oftalmológicos (*ante mortem*) do globo ocular de cães experimentalmente infectados e sororreagentes para leptospirose.
- 3 Verificar a ocorrência de anticorpos contra leptospira no humor aquoso de cães experimentalmente infectados.
- 4 Verificar a presença de DNA de leptospira por meio de PCR no humor aquoso de cães após sete, 15, 30 e 45 dias da inoculação.
- 5 Verificar presença a de leptospira no globo ocular dos cães por meio da técnica de Levaditi.
- 6 Relacionar alterações nos parâmetros físicos dos cães com infecção por leptospira.

### 3 - MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 - Instalação e manejo dos cães

Os cães foram mantidos em baias individuais apropriadas no Hospital Veterinário “Dr. Halim Atique”, do Centro Universitário de Rio Preto - Unirp, com temperatura ambiental não climatizada, recebendo água comum da rede pública e ração comercial “ad libitum”.

#### 3.2 - Seleção dos animais

Foram selecionados 32 cães adultos, recolhidos ao Centro de Controle de Zoonoses do Município de São José do Rio Preto, que não apresentaram título de anticorpos séricos contra as sorovarietades de *Leptospira* spp. apresentadas no Quadro 1, por meio da prova de SAM, em dois testes realizados no intervalo de sete dias e cuja cultura de urina em meio semissólido de Fletcher (Difco) foi negativa nessas duas ocasiões, descartando a possibilidade de os animais serem portadores renais (FAINE, 1982). Para verificação da possibilidade de outras enfermidades foram realizados exames hematológicos pesquisando-se a presença de hemoparasitas e alterações dos parâmetros sanguíneos que indicassem algum tipo de infecção, animais fora do padrão não foram utilizados. Também foi realizada uma verificação quanto a presença de ectoparasitas, realizando-se em todos os animais vermifugação e banho carrapaticida.

Dos 32 animais, 20 foram inoculados com uma cepa patogênica de *Leptospira interrogans* sorovarietade Canicola e 12 receberam aplicação de soro fisiológico, no mesmo volume do inoculado de leptospiros, sendo considerados como grupo controle e tratados da mesma forma que o grupo infectado.

Com a finalidade de avaliar as possíveis alterações do globo ocular *post mortem*, oito cães (cinco inoculados e três controles) foram sacrificados nos dias sete, 15, 30 e 45 após a inoculação. Após o sacrifício, amostras de humor aquoso de um dos olhos<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Por convenção, utilizou-se o olho esquerdo para retirada do humor aquoso e o direito para os exames de coloração.



foram retiradas para realização de PCR e SAM, e o globo ocular do outro olho foi retirado para realização de exame histopatológico e da técnica de coloração de Levaditi. Durante o período de incubação, foram coletadas amostras de sangue, nos dias zero, três, cinco, sete, 10 e, após, a cada cinco dias, inclusive no dia da eutanásia. O soro sanguíneo foi submetido à SAM para estabelecer uma curva de títulos.

Nos dias de colheita dos materiais, foi realizada paralelamente uma avaliação clínica dos cães, tanto dos inoculados quanto dos controles, observando-se principalmente se havia uremia, hemoglobinúria, icterícia, glossite ou estomatite, temperatura dos animais juntamente com um exame oftálmico que incluía a verificação do aspecto externo e exame de fundo de olho.

### **3.3 - Inoculação \***

Foi utilizado um inóculo com a cepa virulenta da sorovariedade Canicola da estirpe LO4 na concentração de  $10^9$  leptospiras por mL. Para obter essas concentrações de leptospiras, as mesmas foram contadas em lâminas microscópicas 24 x 76 mm (FAINE, 1982). Foram inoculados quatro mililitros do inóculo por via subcutânea na região cervicodorsal.

### **3.4 - Exame oftálmico**

Exames oftálmicos foram realizados em todos os animais, por meio de oftalmoscopia direta, em ambiente de baixa luminosidade, seguindo recomendações de GELATT (1991). Neste exame, foi realizada uma observação visual das estruturas internas e de fundo de ambos os olhos de cada cão usando um oftalmoscópio manual, seguido do teste da fluoresceína. Também foi verificada e anotada a presença ou não

---

\*Cepa LO4 - cepa patogênica de *Leptospira interrogans* sorovariedade Canicola, isolada de fígado de suíno, pela equipe do Prof. Dr. Julio César de Freitas, em estudo realizado na Universidade Estadual de Londrina (UEL), gentilmente cedida pelo Instituto Biológico de São Paulo.

de sinais externos ao globo ocular indicativos de lesões e inflamação como lacrimejamento, blefarospasmo, vermelhidão de mucosas e edema de pálpebras.

### **3.5- Colheita das amostras**

#### **3.5.1 – Sangue**

A colheita de sangue foi realizada por venopunção, e o sangue foi dessorado após retração do coágulo. O soro foi então identificado e encaminhado para o exame sorológico, realizado pela técnica de SAM, a fim de estabelecer uma curva de títulos nos animais.

#### **3.5.2 - Humor aquoso e globo ocular**

Amostras de 1,5 mL de humor aquoso foram obtidas dos olhos esquerdos de todos os cães, por meio de punção, via região límbica, utilizando-se agulha 25x07, medida padrão para esta técnica. A coleta foi realizada após a retirada do globo ocular, em seguida da morte dos animais, sendo o olho cuidadosamente limpo com água borcada estéril, para evitar a contaminação da amostra com células sanguíneas que pudessem influenciar a análise do humor aquoso. Posteriormente, as amostras foram identificadas, e uma alíquota destinada para a pesquisa de anticorpos antileptospiras e outra para a realização de PCR.

Os globos oculares do lado direito foram armazenados em formol a 10%, seguindo-se a realização dos exames histopatológicos e da técnica de Levaditi.

### **3.6 – Eutanásia dos animais**

Os animais foram inicialmente sedados com acepromazina na dose de 0,01mg/kg via intravenosa e em seguida, pela mesma via, receberam tionembutal na

dose de 25mg/kg (dose normal 12,5mg/kg) e brometo de pancurônio na dose de 0,11mg/kg I.V. até total parada cardiorrespiratória.

### **3.7 - Pesquisa de anticorpos\***

#### **3.7.1 - Preparo dos antígenos de leptospira**

As sorovariedades de leptospiras utilizados como antígenos foram provenientes de matrizes repicadas semanalmente em meio de cultura EMJH (Ellinghausen, McCullough, Johnson e Harris, Difco) enriquecido com soro sanguíneo de coelho, na proporção de 10%, e mantidos em estufa bacteriológica (B.O.D.) à temperatura de 28°C. Todos os antígenos foram utilizados ao redor do sexto dia de incubação. A concentração considerada ideal foi padronizada de forma a corresponder à metade da turvação do tubo número 1 da escala de MacFarland (100 a 200 leptospiras por campo microscópico), livre de contaminação e de autoaglutinação, segundo as orientações de SULZER & JONES (1980).

#### **3.7.2 - Técnica de Soroaglutinação Microscópica**

Os soros foram diluídos em solução tamponada de Sørensen, segundo SANTA ROSA (1970), sendo a diluição inicial de 1/5. Dessa diluição foram colocadas alíquotas de 50 µL e adicionada igual quantidade de antígeno, resultando na diluição de 1/10. A mistura soro-antígeno foi levemente agitada e incubada em estufa bacteriológica B.O.D. a 28° C por duas horas, procedendo-se a seguir à leitura. O critério adotado para considerar um soro como reagente foi o de 50% de aglutinação, ou seja, metade das leptospiras aglutinadas no campo microscópico no aumento de 100 vezes. O título do

---

\* Realizado no Laboratório de Leptospirose e Brucelose da FCAV/UNESP, sob a supervisão do Prof. Dr. Raul José Silva Girio.

soro foi considerado a recíproca da sua maior diluição que apresentou 50% de aglutinação.

**Quadro 1.** Estirpes de *Leptospira interrogans*\* empregadas como antígeno na reação de soroaglutinação microscópica aplicada à leptospirose, segundo o número de controle (código), o sorogrupo e a variante sorológica.

<b>Código</b>	<b>Sorogrupo</b>	<b>Sorovariedade</b>
1-A	<i>Australis</i>	Australis
1-B	<i>Australis</i>	Bratislava
2-A	<i>Autumnalis</i>	Autumnalis
2-B	<i>Autumnalis</i>	Butembo
3	<i>Ballum</i>	Castellonis
4	<i>Bataviae</i>	Bataviae
5	<i>Canicola</i>	Canicola
6	<i>Celledoni</i>	Whitcombi
7	<i>Cynopteri</i>	Cynopteri
8	<i>Grippotyphosa</i>	Grippotyphosa
9	<i>Hebdomadis</i>	Hebdomadis
10-A	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	Copenhageni
10-B	<i>Icterohaemorrhagiae</i>	Icterohaemorrhagiae
11	<i>Javanica</i>	Javanica
12	<i>Panama</i>	Panama
13	<i>Pomona</i>	Pomona
14	<i>Pyrogenes</i>	Pyrogenes
15-A	<i>Sejroe</i>	Hardjo
15-B	<i>Sejroe</i>	Wolffi
16	<i>Shermani</i>	Shermani
17	<i>Tarassovi</i>	Tarassovi
18	<i>Andamana</i>	Andamana
20	<i>Seramanga</i>	Patoc
ST	<i>Djasiman</i>	Sentot

\* Cedidas gentilmente pelo Prof. Dr. Sílvio Arruda Vasconcellos, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ/USP.

### 3.8 - Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

#### 3.8.1 - Extração de DNA

Para a extração de DNA das amostras de humor aquoso foi utilizada a técnica de lise enzimática com proteinase K (SAMBROOK et al., 1989). A reação foi realizada em microtubos de 1.500 $\mu$ L, de acordo com a sequência de etapas que se seguem:

- Adição de 300 $\mu$ L da amostra clínica.
- Adição de 300 $\mu$ L de tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4 (TE).
- Homogeneização por 10 segundos em agitador de tubos.
- Centrifugação em 13.000 x g/30 min.
- Ressuspensão do sedimento (pélete) em 300 $\mu$ L de tampão de lise.
- Adição de 150 $\mu$ L de tampão fenol.
- Homogeneização por 20 segundos em agitador de tubos.
- Centrifugação da 13.000 x g/5min.
- Transferência de 200 $\mu$ L da fase aquosa para novo tubo de 1.500 $\mu$ L, tomando o cuidado de não aspirar a interface orgânica.
- Adição de 100 $\mu$ L de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico, na proporção de 25/24/1.
- Homogeneização por 10 segundos em agitador de tubos.
- Centrifugação em 13.000 x g/5min.
- Transferência de 100 $\mu$ L da fase aquosa para novo tubo de 1.500 $\mu$ L, tomando o cuidado de não aspirar a interface orgânica.
- Adição de 20 $\mu$ L de acetato de sódio 2M.
- Adição de 240 $\mu$ L de etanol absoluto.
- Homogeneização por inversão.
- Manutenção em -20° C “overnight”.
- Centrifugação em 13.000 x g/15 min.

- Descarte do sobrenadante por inversão e lavagem do pélete com 500µL de etanol 70%.
- Centrifugação da 13.000 g/15 min.
- Secagem do pélete de DNA.
- Ressuspensão do pélete em 30µL de TE com pH 7,4.
- Incubação em banho-maria a 56° C/15min.
- Estocagem a -20° C, ou utilizar imediatamente para amplificação.

### 3.8.2 - Oligonucleotídeos iniciadores empregados na amplificação

Foram utilizados os primers descritos por MÉRIEM et al. (1992), gênero-específicos, de 330 pb.

**Quadro 2** Sequência dos pares de base dos dois primers utilizados no experimento.

PRIMERS	SEQUÊNCIA
Lep 1	5' GGCGGCGCGTCTTAAACATG 3'
Lep 2	3' TTAGAACGAGTTACCCCCCTT 5'

### 3.8.3 - Amplificação do DNA bacteriano

A amplificação das amostras de DNA foi realizada em microtubos de 500µL, com volume final de 25µL, de acordo com o protocolo de MÉRIEM et al. (1992), descrito a seguir

- Adição de 16,1 µL de água ultrapura.
- Adição de 2,5 µL de tampão de reação 10x (500mM KCl; 15mM MgCl<sub>2</sub>; 100mM tris-HCl, pH 9,0).
- Adição de 0,5 µL da mistura de dNTPs (200µM de cada nucleotídeo

[dCTP, dATP, dGTP, dTTP]).

- Adição de 0,75  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (50mM).
- Adição de 1,25  $\mu\text{L}$  de Lep 1 (10 pmol/ $\mu\text{L}$ ).
- Adição de 1,25  $\mu\text{L}$  de Lep 2 (10 pmol/ $\mu\text{L}$ ).
- Adição de 0,15  $\mu\text{L}$  de *Taq* DNA polimerase (5 unidades por  $\mu\text{L}$ ).

Adição de 2,5  $\mu\text{L}$  da amostra de DNA extraído.

#### **3.8.4- Ciclo de amplificação (MERIEN et al., 1992)**

Foi utilizado o ciclo de amplificação preconizado por RICHTZENHAIN et al. (2002). Inicialmente, foi realizada a desnaturação da fita, utilizando a temperatura de 94° C por 5 minutos. Foram empregados 40 ciclos, divididos como descrito abaixo:

- Desnaturação do DNA: 94° C/30seg
- Anelamento dos “primers”: 60° C/30seg
- Polimerização do DNA: 72° C/30seg
- Extensão final: 72° C/5min

#### **3.8.5- Análise do produto amplificado**

A visualização do produto amplificado (330 pares de base) foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 2,0% (p/v), utilizando tampão de corrida TBE 0,5% (0,04M tris-acetato e 0,001M EDTA, pH 8,0), segundo SAMBROOK et al. (1989), como segue.

A cada uma das cavidades do gel foram adicionados 12 $\mu\text{L}$  de uma mistura contendo 10 $\mu\text{L}$  de produto amplificado e 2 $\mu\text{L}$  de corante (azul de bromofenol 0,25%, glicerol 30%). O gel foi submetido a uma voltagem constante de 6-7 V por centímetro de distância entre os eletrodos em cuba horizontal, contendo tampão de corrida TBE 0,5%.

A revelação das bandas foi realizada por meio da imersão do gel em uma solução de brometo de etídio a 5 $\mu\text{g}$  por mL durante 15 minutos e posterior observação em transluminador ultravioleta. O gel foi fotografado pelo sistema EDAS\* (Electrophoresis Documentation and Analysis System - KODAK).

Como controle positivo foi utilizada uma cultura com o sorovariedade Canicola, e como controle negativo foi utilizada água ultrapura.

### 3.9 - Técnica de Levaditi

Essa técnica foi realizada conforme o procedimento descrito por McMANUS E MOWRY (1965)

- Os fragmentos de tecidos foram fixados em formol 10% por 24 horas à temperatura ambiente.
- Lavagem em água corrente por 1 hora.
- Lavagem em álcool 96° por 24 horas.
- Lavagem em álcool - 70° por 24 horas.
- Retirada do álcool e imersão em água.
- Revelação em solução de nitrato de prata (Nuclear 2850), por 72 horas à temperatura de 37 °C, no escuro (Anexo 1).
- Bloqueio da reação em solução redutora, por 24 a 72 horas à temperatura de 37°C, no escuro (Anexo 1).
- Lavagem em água destilada.
- Desidratação em série de álcoois em concentrações crescentes (70%, 95%, absolutos I, II e III) e em xilol.
- Diafanização, impregnação com parafina e inclusão em parafina.
- Cortes em micrômetro (4 a 5 µm) e montagem em resina sintética “PERMOUNT”.

A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de luz óptica (Carl Zeiss) com ocular 10X e objetivas 40X e 100X (imersão), com condensador de campo claro.



### **3.10 – Histopatológico**

Os globos oculares foram fixados em solução neutra de formol a 10%, incluídos em parafina e cortados a cinco micrômetros de espessura para então serem corados pela técnica de hematoxilina e eosina (HE)

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com QUINN et al. (1994) e FAINE (1999), as diferentes sorovariedades de *L. interrogans* não apresentam especificidade de hospedeiro, porém existe a preferência de certas sorovariedades por determinados vertebrados. Exemplo dessa condição é a associação estabelecida entre o cão doméstico e a sorovariedade Canicola. Essa condição aliada aos vários inquéritos sorológicos que indicam essa sorovariedade como uma das principais causadoras da leptospirose canina (FURTADO et al., 1997; ÁVILA et al., 1998; JOUGLARD e BROD, 2000; MASCOLLI, 2001; BATISTA et al., 2005; MAGALHÃES et al., 2006), o que motivou a utilização desta sorovariedade no presente estudo.

Como esperado, nenhum animal do grupo-controle apresentou aglutinação frente à reação de soroaglutinação microscópica (SAM) para as 24 sorovariedades de *Leptospira* spp. utilizadas (Quadro 1), a partir da diluição 1/10; e os demais animais só apresentaram reação a sorovariedade Canicola após a infecção experimental, o que comprova a qualidade das medidas adotadas no ambiente em relação às instalações e ao manejo sanitário.

A confirmação da indução da leptospirose nos cães experimentalmente infectados ficou caracterizada pelos títulos de anticorpos obtidos na prova de SAM, caracterizando a “performance” da virulência da cepa utilizada e assegurando o primeiro parâmetro assentado no delineamento da investigação, que foi o de estabelecer uma população que tivesse um contato efetivo com a leptospira.

Podem-se observar na Tabela 1 os títulos de anticorpos antileptospira dos cães que constituíram o grupo 1 (G1) do experimento, os quais foram eutanasiados após sete dias desde a inoculação. Dos cinco cães, apenas um (G1A1) não apresentou título no período analisado, o que pode ser explicado pelos dados obtidos por REBHUN (1995), que relata que o período de incubação da leptospirose pode ser de até quatorze dias, período em que ocorre septicemia e o início da produção de anticorpos. Os títulos apresentados pelos animais desse grupo variaram de 20 a 1.280.

**Tabela 1.** Títulos de anticorpos aglutinantes encontrados em quatro avaliações nos cinco cães inoculados com a cepa LO4 de *Leptospira interrogans* sorovariedade Canicola pelo período de sete dias, representando o Grupo G1 do presente experimento. Jaboticabal, São Paulo, 2009.

ANIMAIS	Dias de coleta de materiais em relação ao dia da inoculação			
	0	03	05	07
G1A1	-	-	-	-
G1A2	-	-	160	1.280
G1A3	-	20	160	320
G1A4	-	-	320	1.280
G1A5	-	20	80	640

G1: grupo 1, A: animal infectado - : ausência de reação

Na Tabela 2, estão apresentados os títulos dos cães que, após a inoculação, foram observados pelo período de quinze dias, constituindo o grupo 2 do protocolo experimental (G2). Nesse grupo, todos os animais apresentaram títulos detectáveis na prova de SAM durante o período de estudo, os quais variaram de 10 a 1.280.

**Tabela 2.** Títulos de anticorpos aglutinantes encontrados em seis avaliações nos cinco cães inoculados com a cepa LO4 de *Leptospira interrogans* sorovariedade Canicola pelo período de 15 dias, representando o Grupo G2 do presente experimento. Jaboticabal, São Paulo, 2009.

ANIMAIS	Dias de coleta de materiais em relação ao dia da inoculação					
	0	03	05	07	10	15
G2A1	-	10	160	640	1.280	1.280
G2A2	-	-	20	160	320	1.280
G2A3	-	40	80	160	320	320
G2A4	-	10	20	80	320	640
G2A5	-	20	20	160	160	640

G2: grupo 2, A: animal infectado - : ausência de reação

A Tabela 3 mostra os títulos sorológicos obtidos dos animais do grupo três (G3), avaliados durante trinta dias. Os cinco cães infectados apresentaram títulos que variaram de 160 a 1.280. Na Tabela 4, são verificados os títulos do grupo 4 (G4), no qual os cães infectados foram observados por quarenta e cinco dias. No grupo 4 (G4), em todos os animais foi possível a detecção de anticorpos, com títulos que variaram de 20 a 2.560, revelando que houve soroconversão em todos os animais inoculados.

**Tabela 3.** Títulos de anticorpos aglutinantes encontrados em nove avaliações nos cinco cães inoculados com a cepa LO4 de *Leptospira interrogans* sorovariedade Canicola pelo período de 30 dias, representando o Grupo G3 do presente experimento. Jaboticabal, São Paulo, 2009.

ANIMAIS	Dias de coleta de materiais em relação ao dia da inoculação								
	0	03	05	07	10	15	20	25	30
G3A1	-	-	640	1.280	1.280	1.280	1.280	640	640
G3A2	-	-	160	320	640	640	1.280	1.280	1.280
G3A3	-	-	160	320	320	320	320	640	320
G3A4	-	-	160	320	640	1.280	1.280	1.280	640
G3A5	-	-	320	320	320	1.280	1.280	1.280	1.280

G3: grupo 3, A: animal infectado - : ausência de reação

**Tabela 4.** Títulos de anticorpos aglutinantes encontrados em 12 avaliações nos cinco cães inoculados com a cepa LO4 de *Leptospira interrogans* sorovariedade Canicola pelo período de 45 dias, representando o Grupo G4 do presente experimento. Jaboticabal, São Paulo, 2009.

ANIMAIS	Dias de coleta de materiais em relação ao dia da inoculação											
	0	03	05	07	10	15	20	25	30	35	40	45
G4A1	-	-	160	320	320	1.280	320	640	640	640	320	640
G4A2	-	20	640	1.280	1.280	2.560	1.280	2.560	1.280	2.560	640	640
G4A3	-	-	320	640	1.280	2.560	2.560	2.560	2.560	2.560	1.280	1.280
G4A4	-	-	-	80	160	1.280	1.280	2.560	2.560	2.560	2.560	1.280
G4A5	-	-	640	1.280	2.560	2.560	2.560	2.560	2.560	2.560	2.560	2.560

G4: grupo 4, A: animal infectado    -: ausência de reação

Com a intenção de observar de forma mais clara o comportamento da curva de títulos, foi calculada uma média aritmética simples com os títulos sorológicos, de acordo com cada dia de coleta. Entre os dias zero e sete comparamos entre os 20 animais, entre os dias 10 e 15, foram 15 animais, entre os dias 20 e 30, foram 10 animais e entre os dias 35 e 45, a comparação foi dos dados obtidos dos títulos sorológicos de cinco cães.

No humor aquoso, pela técnica de SAM, não houve reação antígeno-anticorpo em nenhuma das amostras coletadas. Nenhum material genético de leptospira foi detectado pela técnica de PCR nas amostras avaliadas. Tampouco foram observadas leptospiras no globo ocular pela técnica de coloração de Levaditi.

A ausência de títulos de anticorpos contra *Leptospira* nos exames do humor aquoso dos animais indica que não ocorreu contato entre os tecidos do globo ocular e as espiroquetas, durante um período de até 45 dias.

Durante o período de bacteremia da infecção por leptospiras, essas podem atingir o globo ocular e multiplicar-se dentro dele (DAVIDSON et al., 1987), e, segundo FAINE (1999), essa ocorrência não depende da sorovariedade infectante. Anticorpos, neste caso, são produzidos localmente, e a observação destes no humor aquoso indica a presença prévia do agente. Os resultados obtidos mostram a não invasão das

leptospiras nos globos oculares dos cães inoculados com a cepa patogênica de *Leptospira*, uma vez que no soro sanguíneo destes animais observaram-se títulos séricos, mas não no humor aquoso, e também não foi observada a presença das bactérias no período de infecção estudado.

É possível que a leptospiremia citada por DAVIDSON et al. (1987) possa ocorrer em um período maior de infecção, dando assim mais tempo para a instalação das leptospiras no globo ocular.

De fato, em apenas dois animais foram observadas alterações macroscópicas, como irritação com hiperemia da esclera em dois cães, e um animal apresentava lacrimejamento, mas todos apresentavam exame de fundo de olho normal, e, pelo exame histopatológico, nenhuma inflamação ou qualquer outro tipo de alteração foi observado durante os 45 dias de infecção dos cães inoculados com a cepa patogênica da sorovariedade Canicola.

É possível que com o uso da sorovariedade Icterohaemorrhagiae, que é implicada como a principal causadora da uveíte recorrente em equinos, poderia ter sido observados resultados positivos nos testes aqui utilizados, e que a *Leptospira* spp. pode levar um tempo maior que 45 dias para atingir o globo ocular de cães, ou que isso poderia ocorrer em uma infecção crônica. Porém neste estudo, da forma como foi conduzido, nas condições em que foram mantidos os 20 animais infectados, durante o período máximo em que permaneceram em observação.

## 5 - CONCLUSÕES

Os resultados obtidos e analisados, nas condições em que foi realizado o presente estudo, segundo a metodologia empregada, possibilitaram as seguintes conclusões:

- não foi possível visualizar *Leptospira* spp. no humor aquoso de nenhum dos cães estudados, analisando-se o globo ocular corado pela técnica de Levaditi;
- não houve reação sorológica, pela técnica de SAM, no humor aquoso de nenhum dos cães estudados;
- não se detectou material genético de leptospiros, pela técnica de PCR, em humor aquoso de animais infectados, por até 45 dias;
- observaram-se pequenas alterações oculares em três animais do grupo de teste, mas não se pode associá-las à infecção por *Leptospira interrogans* sorovariedade Canicola, pela falta de achados mais contundentes.

## 6 - REFERÊNCIAS

ABRAMS, K.L.; BROONKS, D.E. Equine recurrent uveitis: Current concepts in diagnosis and treatment. **Equine Practice**, v. 12, n. 7, p. 27-35, 1990.

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. v.1. Bacteriosis y Micosis. 3 ed. Washington: Organizacion Panamericana de la Salud, 2001. 398p.

ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**. In Press. 2009. Acesso em: 22 fev 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science>>. doi:10.1016/j.vetmic.2009.03.012.

AGESILAS, F.; GEY, F.; MONBRUNT, A.; COMBES, J. C.; LLANAS, B.; SCHLOSSMACHER, P.; GAUZERE, B. A. Acute leptospirosis in children in Reunion Island: a retrospective review of 16 cases. **Archivos de Pediatría**, Barcelona, v. 12, n. 12, p. 1344-1348, 2005.

ALVES, C.J.; ANDRADE, J.S.L.; VASCONCELLOS, S.A.; MORAES, Z.M.; AZEVEDO, S.S.; SANTOS, F.A. Avaliação dos níveis de aglutininas anti-leptospira em cães no município de Patos – PB, Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**. v. 7, p. 17-21, 2000.

AMATREDJO, A.; CAMPBELL, R.S.F.; PATH, M.R.C. Bovine leptospirosis. **Veterinary Bulletin**, v. 45, n. 12, p. 875 - 891, 1975.

ÁVILA, M. O.; FURTADO, L. R. I.; TEXEIRA, M. M. Aglutininas anti-leptospira em cães na área de influência do Centro de Controle de Zoonoses, Pelotas, RS, Brasil, no ano de 1995. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 28, n. 1, p. 107-110, 1998.

BARATON, G.; POSTIC, D. **Méthodes de Laboratoire: leptospirose, borreliose de Lyme**. Paris: Instituto Pasteur, 1989. 107p.

BARNETT, K.C. Equine periodic ophthalmia: A continuing aetiological riddle. **Equine Veterinary Journal**, v. 19, n. 2, p. 90-91, 1987.



BATISTA, C. S. A.; ALVES, C. J.; AZEVEDO, S. S.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z. M.; CLEMENTINO, I. J.; ALVES, F. A. L.; LIMA, F. S.; ARAÚJO NETO, J. O. 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, supl. 2, p. 179-185, 2005.

BEER, J. **Doenças infecciosas em animais domésticos**. v. 2, 1 ed., São Paulo: Livraria Roca, 1988, 380p.

BISTNER, S. Fundus Examination of the Horse. **Veterinary Clinics of North America: Large Animal Practice**, v. 6, n. 3, p. 541-551, 1984.

BLAZIUS, R.D.; ROMÃO, P.R.T.; BLAZIUS, E.M.C.G.; SILVA, O.S. Occurrence of *Leptospira* spp. soropositive stray dogs in Itapema, Santa Cararina, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, n. 6, p. 1952-1956, 2005.

BOLIN, C.A.; ZUERNER, R.L.; TRUEBA, G. Comparison of three techniques to detect *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* typo *hardjo-bovis* in bovine urine. **American Journal of Veterinary Research**, v. 50, n. 7, p. 1001-1003, 1989.

BRIHUEGA, B; HUTTER, E. Incidência de la leptospirosis en caninos de la ciudad de Buenos Aires. **Veterinaria Argentina**, v. 12, n. 120, p. 98-101, 1994.

CALDAS, E.M.; DORIA, J.D.; MARTINS, M.A.S. Inquérito sorológico para leptospirose em *Canis familiares*. **Arquivos da Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais**. v. 1, n. 1, p. 24-31, 1976.

CASTRO, A.F.P.; SANTA ROSA, C.A.; TROISE, C.; CALDAS, A.D. Leptospirose canina em São Paulo: inquérito sorológico e isolamento de *Leptospira icterohaemorrhagiae*. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 23, p. 199-205, 1962.

CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS. **Manual de Métodos para el diagnóstico de laboratorio de la leptospirosis**. Washington, 1985. 46p. (Nota Técnica, 30).

CHAPPEL, R.J.; PRIME, R.W.; MILLAR, B.D.; JONES, R. T.; CUTLER, R. S.; ADLER, B. Prevalence and geographic origin of pigs with serological evidence of infection with

*Leptospira interrogans* serovar *pomona* slaughtered in abattoir in Victoria, Australia. **Veterinary Microbiology**, v. 62, p. 235 - 242, 1998.

CICERONI, L; BARTOLONI, A; PINTO, A; GUGLIELMETTI, P; VALDEZ VASQUEZ, C; GAMBOA BARAHONA, H; ROSELLI, M; GIANNICO, F; PARADISI, F. Serological survey of leptospiral infections in sheep, goats and dogs in Cordillera province, Bolivia. **Microbiologica**, v. 20, n. 1, p. 77-81, 1997.

DAVIDSON, M.G.; NASISSE, M.P.; ROBERTS, S.M. Immunodiagnosis of leptospiral uveitis in two horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 19, n. 2, p. 155-157, 1987.

DWYER, A.E.; CROCKETT, R.S.; KALSOW, C.M. Association of leptospiral seroreactivity and breed with uveitis and blindness in horses: 372 cases (1986-1993). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.207, n.10, p.1327-1331, 1995.

EVERARD, C.O.R.; CAZABON, E.P.I.; DRESSEN, D.W. Leptospirosis in dogs and cats on the island of Trinidad: West Indies. **International Journal of Zoonoses**, v.6, p.33-40, 1979.

FABER, N.A.; CRAWFORD, M.; LEFEBVRE, R.B.; BUYUKMIHCI, N.C.; MADIGAN, J.E.; WILLITS, N.H. Detection of *Leptospira* spp. in the aqueous humor of horses with naturally acquired recurrent uveitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 7, p. 2731-2733, 2000.

FAINE, S. **Guidelines for the control of leptospirosis**. Genova: World Health Organization, 1982. 171 p.

FAINE, S. **Leptospira and leptospirosis**. 2 ed. Melbourne, Australia: MediSci, 1999. 272 p.

FARRINGTON, N.P.; SULZER, K.R. Canine leptospirosis in Puerto Rico. **International Journal of Zoonoses**, v.9, n. 1, p. 45-50, 1982.

FAVERO, A.C.M.; PINHEIRO, S.R.; VASCONCELLOS, S.A.; MORAES, Z.M.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J.S. Sorovarietades de leptospiras predominantes em exames sorológicos de bubalinos, ovinos, caprinos, eqüinos, suínos e cães de diversos estados brasileiros. **Ciência Rural**, v. 32, n. 4, p. 613-9, 2002.

FUKUNAGA, M.; HORIE, I.; OKUZAKO, N.; MIFUCHI, I. Nucleotide sequence of 16S rRNA gene for *Leptospira interrogans* serovar *canicola* strain Moulton. **Nucleic Acids Research**, v.18, n.2, p.366, 1990.

FURTADO, L.R.I.; AVILA, M.O.; FEHLBERG, M.F.B.; TEIXEIRA, M.M.; ROSADO, R.L.I.; MARTINS, L.F.S.; BROD, C.S. Prevalência e avaliação de fatores de risco a leptospirose canina no município de Pelotas – RS. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 64, n. 1, p. 57-61, 1997

GELATT, K.N. **Veterinary ophthalmology**. 2. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991. 765p.

GILLESPIE, D. The magic and challenge of DNA probes as diagnostic reagents. **Veterinary Microbiology**, v.24, p.217-233, 1990.

GINGERAS, T.R.; RICHMAN, D.D.; KWOH, D.Y.; GUATELLI, J.C. Methodologies for in vitro nucleic acid amplification and their applications. **Veterinary Microbiology**, v.24, p.235-251, 1990.

GÍRIO, R.J.S. Abordagem clínica da leptospirose animal. In: ENCONTRO NACIONAL EM LEPTOSPIROSE, 3., 1993. Rio de Janeiro. **Anais...**, Rio de Janeiro: Ministério da Saúde. Instituto Oswaldo Cruz. Fundação Nacional de Saúde, 1993. p. 59-61

HAGIWARA, M.K.; SANTA ROSA, C.A. Leptospirose canina no Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 42, p. 111-118, 1980.

HANSON, L.E. Leptospirosis in domestic animals: The puplic health perspective. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.181, n.12, p.1505 -1509, 1982.

HARKIN, K.R.; ROSHTO, Y.M.; SULLIVAN, J.T. Clinical application of a polymerase chain reaction assay for diagnosis of leptospirosis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 222, n.9, p. 1224-1229, 2003.

HARTSKEERL, R.A.; GORIS, M.G.A.; BREM, S.; MEYER, P.; KOPP, H.; GERHARDS, H.; WOLLANKE, B. Classification of *Leptospira* from the eyes of horses suffering from recurrent uveítas. **Journal of Veterinary Medicine**. v. 51, n. 3, p. 110-115, 2004.

HEINEMANN, M. B.; GARCIA, J. F.; NUNES, C. M.; GREGORI, F.; HIGA, Z. M. M.; VASCONCELLOS, S. A.; RICHTZENHAIN, L. J. Detection and differentiation of *Leptospira spp.* serovars in bovine semen by polimerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 73, n. 4, p. 261-267, 2000.

HINES, M.T. Immunologically mediated ocular disease in the horse. **Veterinary Clinics of North America: Large Animal Practice**, v. 6, n. 3, p. 501-512, 1984.

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.

LILENBAUM, W., RIBEIRO, V. L., BRUSTEIN, R. Leptospirose em cães clinicamente suspeitos no Rio de Janeiro, Brasil. **A Hora Veterinária**., v. 14, n.81, p. 48-49, set/out. 1994.

LOBO, E A.; LOVATTO, P.; TAUTZ, S.; PIRES NETO, J. A., SILVA, M. Ocorrência e predominância sorológica da leptospirose animal no município de Santa Cruz do Sul, RS, Brasil. **A Hora Veterinária**, v.27, p. 37-39. 2007.

LOBO, E. A., TAUTZ, S., LOVATTO, P. B.. Caracterização do padrão sorológico animais domésticos potencialmente transmissores da Leptospirose no Município de Santa Cruz do Sul, RS, Brasil. **A Hora Veterinária**, v. 23, n. 134, 29-32. 2003.

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. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n.2, p. 167-174, 2006.

MASCOLLI, R. **Inquérito sorológico para leptospirose, doença de Lyme e leishmaniose em cães do município de Santana de Parnaíba, São Paulo. Colheitas efetuadas durante a campanha de vacinação anti-rábica, no ano de 1999.** 2001. 140 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

MCMANUS, J.F.A.; MOWRY, R.W. **Staining Methods - Histologic and Histochemical.** 3<sup>o</sup> ed. New York: Harper & Row, 1965. p. 370-371.

MEEYAM, T.; TABLERK, P.; PETCHANOK, B.; PICHPOL, D.; PADUNGTOD, P. Seroprevalence and risk factors associated with leptospirosis in dogs. **Southeast Asian Journal of Tropic Medicine Public Health**, v. 37, n. 1, p.148-153, 2006.

MÉRIEN, F.; AMOURIAX, P.; PEROLAT, P.; BARANTON, G.; SAINT GIRONS, I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira spp.* in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, n.9, p.2219-2224, 1992.

MILLER, T.R.; WHITLEY, R.D. Uveitis in horses. **Modern Veterinary Practice**, v. 68, n. 6, p. 351-357, 1987.

MORALES, A.; GÍRIO, R.J.S.; MATHIAS, L.A. Casos de leptospirose em cães atendidos no hospital veterinário durante o período de 1986 a 1990. **Ciência Veterinária**, v. 4, n. 2, p. 5-6, 1990.

MYERS, D. M. Leptospiral antibodies in stray dogs of Moreno, Province of Buenos Aires, Argentina. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 12, n. 1, p. 18-22, 1980.

NOGUCHI, H. The survival of *Leptospira* (Spirochaeta) *icterohaemorrhagiae* in nature: Observations concerning microchemical reactions and intermediary hosts. **Journal of Experimental Medicine**, v. 27, p. 609 - 625, 1918.

OLIVEIRA, S.J. Nova ameaça à reprodução em suínos, além da leptospirose? **Hora Veterinária**, v. 19, p. 87 - 90, 1999.

PAUL, P.S. Applications of nucleic acid probes in veterinary infectious diseases. **Veterinary Microbiology**, v.24, p.409-417, 1990.

PINEDA, M.; LÓPEZ, J.; GARCIA, M. Frecuencia de leptospirosis en perros al test de aglutinación microscópica en Chillán-Chile. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 28, p. 59-66, 1996.

PRESCOTT, J.F.; MCEWEN, B.; TAYLOR, J.; WOODS, J.P.; ABRANS-OGG, A.; WILCOCK, B. Resurgence of leptospirosis in dogs in Ontario: recent findings. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 43, n. 12, p. 955-961, 2002.

QUERINO, A. M. V.; DELBEM, A.C.B.; OLIVEIRA, R.C.; SILVA, F.G.; MULLER, E.E.; FREIRE, R.L.; FREITAS, J.C. Fatores de risco associados a leptospirose em cães do município de Londrina, PR. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina v. 24, n. 1, p. 27-34, 2003.

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. **Clinical Veterinary Microbiology**. Madri: Grafos, 1994. p. 292 - 303.

RATNAM, S.; EVERARD, C.O.R.; ALEX, C. A pilot study on the prevalence of leptospiroses in Tamilnades state. **Indian Journal of Veterinary Medicine**, v. 71, p. 1059-63, 1994.

REBHUN, W.C. **Diseases of Dairy Cattle**. Baltimore: Willians & Wilkins, 1995. p. 472 - 474.

RICHTZENHAIN, L. J.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M. B.; SOARES, R. M.; SAKAMOTO, S. M.; VASCONCELLOS, S. A.; HIGA, Z. M.; SCARCELLI, E.; GENOVEZ, M. E. A multiplex PCR for the

detection of *Brucella* spp. and *Leptospira* spp. DNA from aborted bovine fetuses. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 87, n. 2, p. 139-147, 2002.

ROSSETI, C.A.; ROMERO, G.N.; AUTERI, C.D. Estudio serológico de leptospirosis em perros de partidos del Oeste del Gran Buenos Aires. **Revista de Medicina Veterinária**, v.80, p.298–305, 1999.

RUBEL, D.; SEIJO, A.; CERNIGOLI, B.; VIALE, A.; WISNIVESKY-COLLI, C. *Leptospira interrogans* en una población canina del Gran Buenos Aires: variables asociadas com la seropositividad. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 2, n. 2, p. 102-5, 1997.

RYU, E. An international survey of leptospiral agglutinin of dogs by RMAT. **International Journal of Zoonoses**, v. 3, n. 1, p. 33-60, 1976.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 1 ed., Cold Spring Harbor Press, New York, 1989, 957p.

SANTA ROSA, C. A. Diagnóstico laboratorial das leptospiroses. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.1, n. 1, p. 97-109,1970.

SANTIN, K., SELLA, A. B., NADVORNY, A., WOLFFENBÜTTEL, S., CARDOSO, M. R., I., SCHMIDT, V. Pesquisa de aglutininas anti-*Leptospira* em cães clinicamente sadios e em cães com suspeita clínica de leptospirose. São Paulo, **Clínica veterinária**, São Paulo, n.60, p.48-52, jan./fev. 2006.

SCHWINK, K.L. Equine Uveitis. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 8, n. 3, p. 557-574, 1992.

SILLERUD, C.L.; BEY, R.F.; BALL, M.; BISTNER, S.I. Serologic correlation of suspected *Leptospira interrogans* serovar Pomona-induced uveitis in a group of horses. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 191, n. 12, p. 1576-1578, 1987.

SOBIECH, E. Prevalence of antibodies against selected *Leptospira* serotypes in canine sera. **Życie Weterynaryjne**, v. 74, n. 7, p. 332-33, 1999.

STADES, F.C.; BOEVÉ, M.H.; NEUMANN, W.; WYMAN, M. **Fundamentos de oftalmologia veterinária**. São Paulo: Manole, 1999. 240 p.

SULZER, C.R.; JONES, W.L. **Leptospirosis: method in laboratory diagnosis**. Atlanta: Center for Diseases Control, U. S., Dept. Health Education and Welfare, 1980. 40p.

SWENSON, M.J. **Dukes fisiologia dos animais domésticos**. 10. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1984. 799 p.

THIERMANN, A. B. Leptospirosis: current developments and trends. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 184, n. 6, p.722 - 725, 1984.

TOWNSEND, W.M.; STILES, J.; KROHNE, S.G. Leptospirosis and panuveitis in a dog. **Veterinary Ophthalmology**, v. 9, n. 3, p. 169-173, 2006.

VASCONCELLOS, S.A. Leptose em animais domésticos e silvestres - prevenção e controle. **Oficina Estado da Arte e Prioridades para P&D em Leptose/FIOCRUZ**, Salvador 10 e 11 de abril de 2000.

VASCONCELLOS, S.A. O papel dos reservatórios na manutenção de leptospiroses na natureza. **Comunicação Científica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 11, n. 1, p. 17 - 24, 1987.

WEEKES, C.C.; EVERARD, C.O.; LEVETT, P.N. Soroepidemiology of canine leptospirosis on the island of Barbados. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 57, 2. 2-3, p. 215-222, 1997.

WHITLEY, R.D.; MILLER, T.R.; WILSON, J.H. Therapeutic considerations for equine recurrent uveitis. **Equine Practice**, v. 15, n. 5, p. 16-23, 1993.

YASUDA, P.H.; Santa Rosa, C.A.; Yanaguita, R.M. Variação sazonal na prevalência de leptose em cães de rua na cidade de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 14, n. 4, p. 589-96, 1980.



ZARAGOZA, C.; BARRERA, R.; CENTENO, F.; TAPIA, J.A.; MAÑÉ, M.C. Characterization of renal damage in canine leptospirosis by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamine gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blotting of the urinary proteins. **Journal of Comparative Pathology**, v. 129, n. 2-3, p. 169-178, 2003.

## ANEXO

Solução, meios de cultura, diluidores e tampões utilizados no trabalho.

### 1 - SOLUÇÃO TAMPONADA DA SÖRENSEN pH 7,5

- Fosfato di-sódico anidro.....8,33g
- Fosfato monopotássico.....1,09g
- Água destilada.....1.000mL

### 2 - MEIO DE CULTURA EMJH (Difco - 0987-01)

- Sódico fosfato dibásico.....1g
- Potássio fosfato monobásico.....0,3g
- Cloreto de sódio.....1g
- Cloreto de amônia.....0,25g
- Tiamina.....0,005g
- Água destilada.....900mL

### 3 - DILUIDORES

#### a) TE pH 7,4

- Tris HCl 10mM
- EDTA 1mM (Ethylenediaminetetracetic acid - sal)

#### b) Solução tampão de lise (proteínase K)

- Proteínase K a 20mg/mL.....15µL
- Dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%....30µL
- TNE 5x.....60µL
- Água ultrapura.....195µL

#### c) TNE 5x pH 8,0

- Tris 50mM
- NaCl 500mM
- EDTA 125mM

#### d) Solução tampão de reação 10x pH 9,0

- KCl.....500mM
- MgCl<sub>2</sub>.....15mM
- Tris HCl.....100mM

### 4 - GEL DE AGAROSE 2,0%

- Tampão TBE (0,5 x).....100mL
- Agarose.....2,0g

#### 5 - TAMPÃO DE CORRIDA TBE pH 8,0

- Tris acetato 0,004M
- EDTA 0,001M

#### 6 - SOLUÇÃO DE NITRATO DE PRATA

- Nitrato de prata 2,0g
- Água deionizada q.s.p.100mL

#### 7 - SOLUÇÃO REDUTORA

- Ácido pirogálico 4,0g
- Formol puro 5mL
- Água deionizada q.s.p.100mL