

Ana Lúcia Scarelli Lopes

Freqüência de cães sorologicamente reagentes para leptospirose, na área territorial urbana do município de Botucatu-SP, e a sua correlação com os fatores predisponentes ambientais e de criação

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Medicina Veterinária, área de Vigilância Sanitária

Orientador: Prof. Adj. José Rafael Modolo

Co-orientador: Prof. Adj. Hélio Langoni

BOTUCATU-SP

2003

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Elza Numata

Lopes, Ana Lúcia Scarelli.

Freqüência de cães sorologicamente reagentes para leptospirose, na área territorial urbana do município de Botucatu-SP, e a sua correlação com os fatores predisponentes ambientais e de criação / Ana Lúcia Scarelli Lopes. – 2003.

97 f ; 30cm .

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

Orientador: José Rafael Modolo

Co-orientador: Hélio Langoni

Assunto CAPES: 50502018

1. Leptospirose em animais - Epidemiologia 2. Cão - Doenças - Epidemiologia

CDD 636.7089695

Palavras-chave: Leptospirose; Cães; Sorologia

DEDICATÓRIA

A Deus, inteligência suprema,
causa primeira de todas as
coisas.

A vocês, meus pais, queridos **Elza e Gregório**, dedico mais esta conquista, com a mais profunda admiração e respeito;

a vocês, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade;

a vocês, que iluminaram os caminhos escuros com afeto e dedicação, para que eu pudesse trilhá-los sem medo e com esperança;

a vocês, que se doaram por inteiro e renunciaram a seus sonhos, para que muitas vezes eu pudesse realizar os meus;

a vocês, pais por natureza, por opção e amor, não bastaria dizer que não tenho palavras para agradecer tudo isso.

Mas é com grande emoção que procuro uma forma verbal de expressar um muito obrigada.

**Ao meu irmão Fernando e à minha
cunhada, sempre amiga, Mônica,**

pelo carinho, preocupação, apoio e presença nos
momentos mais difíceis, a minha eterna gratidão.

Ao meu namorado Adriano,

pelo amor, apoio, compreensão, paciência e por estar
sempre ao meu lado, dividindo as situações mais
delicadas.

Ao meu orientador,

Prof. Adj. José Rafael Modolo que, mesmo sem me conhecer, depositou em mim sua confiança, transmitindo com dedicação sua experiência profissional e pessoal, sempre visando a ética e a idoneidade científica;

por toda a sua incansável dedicação, incentivo e paciência, sempre tentando proporcionar as melhores condições para a realização deste projeto;

meu muito obrigada.

AGRADECIMENTOS

Ao co-orientador deste trabalho, Prof. Adj. Hélio Langoni, que deixou seu laboratório à disposição.

Ao Prof. Titular Carlos Padovani, do Departamento de Bioestatística do Instituto Biociências de Botucatu, pela análise estatística dos dados, e total disposição em esclarecer as dúvidas.

Ao Prof. Ass. Dr. Antônio Carlos Paes, pelos ensinamentos, dedicação, amizade e sensibilidade às minhas dificuldades.

A todos os professores que, de certa forma, auxiliaram na minha formação.

A todos os colegas de pós-graduação pelo aprendizado e companheirismo.

Um agradecimento especial ao grande amigo Welligton Borges da Silva, "Liguito", pela sua sincera amizade, paciência, compreensão e dedicação durante todas as fases da realização deste trabalho.

À amiga Luciany Mary Pagan, pelas atitudes solidárias, lealdade, companheirismo e pela grande amizade que há de ser conservada.

A todos os amigos que auxiliaram na colheita de sangue para que este trabalho pudesse ser realizado, a minha eterna gratidão.

Aos amigos da "República dos Belos", Juliana Semin Cavalheiro, Amanda Keller Siqueira, Isabela Bazzo e Cristiano Galhardi que me estenderam as mãos nos momentos mais difíceis, cuja imensa solidariedade jamais esquecerei.

À Erica Maemi Tanaka, pelos valiosos ensinamentos, grande ajuda prestada e amizade.

A todos da Disciplina de Zoonoses, que sempre dispensaram seus auxílios sem medir esforços, aos residentes André Peres Barbosa de Castro, Júlia Plombon Pinheiro, Rodrigo Costa da Silva e aos pós-graduandos André Oliveira de Mendonça, Aristeu Oliveira da Silva, Fábio Hiroto Shimabukuro, Sandia Bergamashi Pezerico e Vanessa Yuri de Lima.

Aos pós-graduandos da Vigilância Sanitária, Anee Valéria Mendonça Stachissini, Bárbara Lima Simioni Leite e Marco Antônio Vigilato, pela ajuda prestada.

A todos os funcionários do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, da FMVZ/UNESP/Botucatu-SP, em especial ao secretário José Wanderley Forlin e Sérgio Fávero, sempre solícitos.

Às funcionárias Tânia Maria Martins e Adriana Cristina Pavan Vieira, pela contribuição neste trabalho.

À Rosângela Maria Giarola, do Laboratório de Saúde Coletiva do Departamento de Saúde Pública da Faculdade de Medicina/UNESP/Botucatu-SP, pelo auxílio prestado.

À secretária da pós-graduação Denise Aparecida Fioravante Garcia.

Aos funcionários da biblioteca do Campus de Botucatu, pelo auxílio e orientação.

À bibliotecária Rosemery Cristina da Silva,
pela revisão da organização das referências
bibliográficas.

A todos aqueles que, embora não estejam
aqui citados, direta ou indiretamente contribuíram para
que este trabalho fosse realizado,

os meus sinceros agradecimentos.

EPÍGRAFE

“O prazer de fazer o futuro é melhor do que recebê-lo pronto”.

Do livro “Otimismo em gotas” – Lourival Lopes

RESUMO

RESUMO

LOPES, A.L.S. Frequência de cães sorologicamente reagentes para leptospirose, na área territorial urbana do município de Botucatu-SP, e a sua correlação com os fatores predisponentes ambientais e de criação. Botucatu, 2003. 96p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

Durante a 33.^a campanha de vacinação anti-rábica em cães, em 2001, no município de Botucatu-SP, foram colhidas mil amostras de sangue, em vinte postos representativos de quarenta postos, distribuídos geográfica e homogeneamente na área territorial urbana de Botucatu-SP. As amostras foram submetidas ao exame de soroaglutinação microscópica (SAM) aplicada à leptospirose, utilizando como antígeno, para tal, 24 sorovares de leptospira. A frequência de 17,9% de ocorrência de *Leptospira* spp. em cães foi correlacionada com um inquérito realizado com os proprietários dos animais, para determinar alguns fatores de risco à leptospirose canina. A análise estatística apontou significância na correlação entre animais soropositivos e aqueles que tinham contato com roedores e animais que tinham acesso à rua. Já na correlação entre animais de residências não ligadas à rede pública de esgoto e a soropositividade não foi observado significância estatística. Os títulos detectados na prova de aglutinação microscópica variaram entre 1:100 e 1:12800. Foram detectados anticorpos contra os sorovares *castellonis* (28,68%), *autumnalis* (19,12%), *pyrogenes* (17,65%), *icterohaemorrhagiae* (11,03%), *canicola* (9,56%), *australis* (4,41%), *shermani* (3,68%), *copenhageni* (1,47%), *grippotyphosa* (1,47%), *brasiliensis* (0,73%), *butembo* (0,73%), *panama* (0,73%) e *wolffi* (0,73%). Os resultados mostram a diversidade de sorovares envolvidos na epidemiologia da leptospirose canina, bem como fatores de riscos aos quais cães estão expostos, servindo dessa maneira como alerta ao risco de infecção humana.

ABSTRACT

ABSTRACT

LOPES, A.L.S. Frequency of dogs presenting with serological reaction to leptospirosis in the urban area of the city of Botucatu and its correlation to predisposing factors related to environment and breeding. Botucatu, 2002. 96p. Dissertation (Master of Science) – School of Veterinary Medicine and Zootechnics, Botucatu Campus, São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho”.

During the 33rd vaccination campaign against rabies in dogs in 2001, in the city of Botucatu, SP, Brazil, thousand blood samples were collected at twenty immunization centers representative of forty immunization centers, geographically and homogeneously distributed in the urban area of Botucatu. The samples were submitted to the microscopic agglutination test (MAT) applied to leptospirosis, making use of 24 leptospire serovars as antigens. The 17.9% frequency of occurrence of *Leptospira* spp. in dogs was compared to a questionnaire applied to the owners of the animals in order to determine some risk factors to canine leptospirosis. Statistical analysis demonstrated significance in the correlation between seropositive animals and those that had already been in contact with rodents or had free access to the street. No statistical significance could be found when correlating seropositivity and those animals living in areas with no sewerage system. The titers detected on the microscopic agglutination test ranged from 1:100 to 1:12800. Antibodies were detected for the serovars *castellonis* (28.68%), *autumnalis* (19.12%), *pyrogenes* (17.65%), *icterohaemorrhagiae* (11.03%), *canicola* (9.56%), *australis* (4.41%), *shermani* (3.68%), *copenhageni* (1.47%), *grippotyphosa* (1.47%), *brasiliensis* (0.73%), *butembo* (0.73%), *panama* (0.73%) and *wolffi* (0.73%). The results demonstrated the large diversity of serovars involved in the epidemiology of canine leptospirosis, as well as the risk factors to which the dogs are exposed, therefore highlighting the risk to human infection.

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS	20
LISTA DE FIGURAS	21
1. INTRODUÇÃO	23
2. REVISÃO DE LITERATURA	26
3. OBJETIVOS	47
4. MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1 Caracterização do município de Botucatu-SP	49
4.2 Padronização da amostragem	49
4.3 Alocação dos animais e dos postos	50
4.4 Questionário aplicado ao proprietário do cão.....	50
4.5 Colheita das amostras.....	51
4.5.1 Sangue	51
4.6 Procedimento Laboratorial	51
4.6.1 Meios de cultura	51
4.6.2 Antígenos	52
4.6.3 Prova de Soroaglutinação Microscópica (SAM)	53
4.6.3.1 Triagem	53
4.6.3.2 Titulação	55
4.7 Análise Estatística	56
5. RESULTADOS	59
6. DISCUSSÃO	72
7. CONCLUSÕES	80
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*	83
ANEXOS	94

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Gêneros e genomespécies da família *Leptospiraceae*, indicando sorovar, cepa padrão e número total de sorovares por genomespécie..... 27

TABELA 2 - Resultado sorológico antileptospírico dos cães amostrados, na área territorial urbana de Botucatu, São Paulo, Brasil, 2001 59

TABELA 3 - Distribuição do resultado sorológico antileptospírico dos cães amostrados, em relação ao acesso do animal à rua ou não, segundo informações dos seus donos, na área territorial urbana de Botucatu, São Paulo, Brasil, 2001 60

TABELA 4 - Distribuição do resultado sorológico antileptospírico dos cães amostrados, em relação ao contato com roedores ou não, segundo informações dos seus donos, na área territorial urbana de Botucatu, São Paulo, Brasil, 2001 60

TABELA 5 - Distribuição do resultado sorológico antileptospírico dos cães amostrados, de acordo com residência ligada a rede pública de esgoto ou não, segundo informações dos seus donos, na área territorial urbana de Botucatu, São Paulo, Brasil, 2001 61

TABELA 6 - Distribuição do resultado da soroaglutinação microscópica (SAM) antileptospírica em cães, em 20 postos de colheita, na área territorial urbana de Botucatu, São Paulo, Brasil, 2001 63

TABELA 7 - Dinâmica sorológica antileptospírica em cães vacinados, de acordo com o período da vacinação contra a leptospirose, segundo informantes, na área territorial urbana de Botucatu, São Paulo, Brasil, 2001 64

TABELA 8 - Distribuição dos títulos antileptospíricos máximos em cães, frente a 24 sorovares testados, na área territorial urbana de Botucatu, São Paulo, Brasil, 2001 66

TABELA 9 - Distribuição dos títulos máximos de coaglutinações antileptospíricas em cães, ocorridas na prova de soroaglutinação microscópica (SAM), na área territorial urbana de Botucatu, São Paulo, Brasil, 2001 68

TABELA 10 - Distribuição de todas reações com títulos antileptospíricos menores ocorridos em cães, frente a 24 sorovares testados, na área territorial urbana de Botucatu, São Paulo, Brasil, 2001 69

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Questionário aplicado aos proprietários dos cães submetidos ao exame de soroaglutinação microscópica (SAM)..... 50

QUADRO 2 - Sorovares mantidos em meio de cultura líquido de EMJH com albumina bovina "Tween 80", no Laboratório de Zoonoses da FMVZ/UNESP/Botucatu-SP, para utilização na prova de SAM 52

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Mapa da área territorial urbana de Botucatu-SP, com demarcação dos vinte postos onde se realizaram as colheitas 62

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O estudo do comportamento da infecção dos animais por leptospirosas é de extrema importância, pois constitui um problema sanitário, não somente pela gravidade de sua patogenia, mas também por ser elemento potencial de contágio, tanto para outros animais como para o ser humano.

As diferentes espécies animais domésticas podem ser suscetíveis ou portadoras sadias, havendo sempre um hospedeiro-reservatório infectado para “suprir” o ambiente com a bactéria, pela leptospirose permanente/intermitente ou transitória.

O cão, por ter um estreito contato com o homem, pode se constituir em importante fonte de infecção, dando continuidade ao aparecimento da doença tanto nos seres humanos, quanto em outros animais.

A leptospirose humana foi considerada, pela Fundação Nacional de Saúde do Brasil, em 1995, como doença socioeconômica, acometendo indivíduos com profissões de baixo nível de remuneração e residentes em precárias condições.

No homem, como nos animais, as principais manifestações clínicas variam muito em tipo e severidade, podendo a infecção ocorrer de forma assintomática. Por isso, é de suma importância a necessidade do diagnóstico laboratorial, não somente para uma confirmação dos casos clínicos, como também para identificar animais portadores, determinar a extensão do problema e desenvolver medidas de controle da doença.

Por tratar-se de grave zoonose, de elevada prevalência em animais silvestres, domésticos e no homem, justificam-se as ações para a profilaxia e controle dessa enfermidade.

REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

A leptospirose é uma doença mundialmente difundida (GÍRIO, 1987; ZUERNER & BOLIN, 1997), comum nos animais sejam eles de estimação, de produção ou silvestres, que podem ser fonte de infecção para humanos (ZUERNER et al., 1995). Vem sendo motivo de grande preocupação, tanto nos países em desenvolvimento quanto nos desenvolvidos, afetando a saúde animal (GUIMARÃES et al., 1982/83), a economia de produção (GÍRIO, 1990) e a saúde pública (FAINE, 1982).

Andre-Fontaine & Ganieri (1990) relata que, nos EUA, das doenças humanas transmitidas por animais, a leptospirose ocupa o segundo lugar.

A primeira observação de uma doença humana caracterizada por febre, icterícia e hemorragias petequiais, e que provavelmente era leptospirose, foi descrita por Larrey, em 1800. Hofer, em 1850, descreveu, em cães, uma enfermidade que, mais tarde, foi considerada como similar à doença descrita por Weil, na Alemanha. Weil, em 1886, descreveu uma doença humana como entidade clínica específica, mais tarde reconhecida como sendo leptospirose (CORRÊA & CORRÊA, 1992a).

O Subcomitê do gênero *Leptospira*, da Organização Mundial da Saúde, em 1962, recomendou a divisão em duas espécies: *Leptospira interrogans*, patogênica e *Leptospira biflexa*, saprófita (BRASIL, 1995).

O Subcomitê em taxonomia da *Leptospira*, em 1992, propôs a subdivisão da espécie *Leptospira interrogans* em seis espécies: *L. borgpetersenii*, *L. interrogans*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. weilii*, *L.*

kirschneri – com base em critérios de diferenciação molecular entre os diversos sorovares (QUINN et al., 1994).

Conforme Baranton (1998), o Grupo de Genética Molecular de Leptospiras, Instituto Pasteur de Paris, utilizando o método de hidroxapatita no estudo da relação entre o DNA dos diversos sorovares dessa bactéria, propôs modelo de classificação em espécies genômicas ou genomespécies, acrescentando, às seis espécies acima, outras 11, formando três gêneros, ou seja, *Leptospira*, *Turneria* e *Leptonema*, compreendendo 301 sorovares (TABELA 1).

TABELA 1 - Gêneros e genomespécies da família *Leptospiraceae*, indicando sorovar, cepa padrão e número total de sorovares por genomespécie

Gênero e genomespécie	Sorovar padrão	Cepa padrão	N.º de Sorovares
<i>Leptospira interrogans</i>	<i>icterohaemorrhagiae</i>	RGA	91
<i>Leptospira kirschneri</i>	<i>cynopteri</i>	3522 C	29
<i>Leptospira noguchii</i>	<i>panama</i>	CZ 214	20
<i>Leptospira santarosai</i>	<i>shermani</i>	1342K	65
<i>Leptospira borgpetersenii</i>	<i>javanica</i>	Veldrat Batavia 46	47
<i>Leptospira weilii</i>	<i>ranarum</i>	Iowa City Frog (ICF)	15
<i>Leptospira wolbachii</i>	<i>codice</i>	CDC	2
<i>Leptospira inadai</i>	<i>lyme</i>	10	10
<i>Leptospira meyeri</i>	<i>semaranga</i>	Veldrat Semarang 173	5
<i>Leptospira biflexa</i>	<i>patoc</i>	Patoc I	2
<i>Turneria parva</i>	<i>parva</i>	H	1
<i>Leptonema illini</i>	<i>illini</i>	3055	3
<i>Leptospira</i> genomespécie 1	<i>pingchang</i>	80-412	2
<i>Leptospira</i> genomespécie 2	<i>manhao3</i>	L 60	6
<i>Leptospira</i> genomespécie 3	<i>holland</i>	Waz Holland (P438)	1
<i>Leptospira</i> genomespécie 4	<i>hualin</i>	LT 11-33	1
<i>Leptospira</i> genomespécie 5	<i>são paulo</i>	São Paulo	1

A leptospira é uma bactéria móvel, não capsulada nem esporulada, que se multiplica por fissão transversa. Os movimentos são de saca-rolhas e de flexão e extensão, todos associados, dando-lhe rápida e característica mobilidade (CORRÊA & CORRÊA, 1992a). Sobrevive em ambientes úmidos (lama e água em torno de 20°C) e não resiste à dessecação (SÃO PAULO, 1983). Multiplica-se otimamente em pH 7,2 a 7,4 e, experimentalmente, foi constatado que persiste na água por até 180 dias. O sorovar *icterohaemorrhagiae* morre em dez minutos à temperatura de 56°C e, em 10 segundos, à de 100°C. As leptospiros patogênicas sobrevivem ao frio e até ao congelamento (cem dias a 20°C negativos). Podem ser liofilizadas e são muito sensíveis aos ácidos, com perda de motilidade em 15 minutos, quando em solução de ácido clorídrico a 1:2000 (BRASIL, 1995). No leite não diluído, a sobrevivência é curta, mas aumenta quando é diluído em água (VERONESI, 1972).

Em grande parte da América tropical e subtropical, as abundantes precipitações pluviométricas, os receptáculos naturais de água, as altas temperaturas e a variedade de espécies hospedeiras facilitam a cadeia de eventos necessários para a transmissão da leptospirose (SZYFRES, 1976). Dessa forma, os fatores climáticos, incluindo índice pluviométrico, temperatura e umidade relativa do ar, influem de maneira decisiva sobre a ocorrência da doença. Ecologicamente, a existência e a dispersão da leptospirose são mais favorecidas nas regiões tropicais e subtropicais que nas temperadas (BRASIL, 1995).

Um sorovar tem tendência a ser associado com um hospedeiro primário, o qual pode ser infectado por outros sorovares que estão associados a outras espécies de animais. Um mesmo animal pode servir como hospedeiro específico para um sorovar, em certa área, e para outro sorovar, em outra parte do mundo (MAILLOUX, 1975).

Apesar de poucos cães apresentarem a leptospirose-doença, a causada pelo sorovar *canicola* é chamada de "doença de Stuttgart" ou "Tifus canino" e a causada pelo sorovar *icterohaemorrhagiae* é denominada de "doença de Weil" (CORRÊA & CORRÊA, 1992b).

Os cães domiciliados podem adquirir a leptospirose pela convivência com outros cães e ratos que urinam em áreas comuns. Animais que vivem em áreas urbanas periféricas, cujas condições sanitárias e de infra-estrutura são precárias, junto a lixões, esgoto a céu aberto, depósitos de materiais descartados, restos alimentares e promiscuidade com outras espécies animais, constituem-se particularmente em populações de risco (GENOVEZ, 1996).

Como o cão freqüentemente pode ser infectado pelo agente da leptospirose, é considerado um excretor e reservatório subclínico (CALDAS et al., 1977), pois, aparentemente sadio, pode albergar leptospiros e eliminá-las ao meio ambiente, propiciando, desse modo, a disseminação para outras espécies e, por viver em contato direto com o homem, representa um elo de transmissão dessa enfermidade, sendo os sorovares *canicola* e *icterohaemorrhagiae* os mais importantes associados à espécie canina (ALVES et al., 2000).

Os roedores, em geral, se comportam como portadores permanentes de vários sorovares de leptospiros. Isso faz com que ambientes por onde circulam tais animais estejam permanentemente contaminados por esse agente. Em consequência disso, constituem uma fonte perene de infecção tanto para outras espécies de animais como para o homem (SANTA ROSA et al., 1980). Os ratos são conhecidos como fonte de *L. interrogans* sorovar *icterohaemorrhagiae* (BLOOD & RADOSTITS, 1991) e o *Rattus norvegicus* é o hospedeiro de manutenção da *L. copenhageni* (ELLISON & HILBINK, 1990). A partir dos ratos, duas são as principais formas de infecção em cães: ou eles contaminam o solo,

a água e os alimentos dos cães com sua urina, ou estes são caçados e comidos (CORRÊA & CORRÊA, 1992b).

Na cidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, Veronesi et al. (1956) realizaram um inquérito sorológico para leptospirose em 125 cães provenientes do biotério da Faculdade de Medicina e do depósito da Prefeitura Municipal, utilizando como antígenos os sorovares *icterohaemorrhagiae*, *canicola*, *grippotyphosa*, *pomona*, *sejroe*, *bataviae*, *australis*, *bovis* e *hyos*. A prova utilizada foi a de soroaglutinação microscópica, considerando como animais reagentes aqueles com título igual ou superior a 1:200. Dessas amostras testadas, 12 reagiram, sendo seis contra o sorovar *canicola* e seis contra o sorovar *icterohaemorrhagiae*, perfazendo um total de 9,6% de 125 cães. O maior título encontrado foi de 1:600, em relação aos dois sorovares.

Santa Rosa et al. (1969/70), no Instituto Biológico de São Paulo, Brasil, durante nove anos, examinaram 426 amostras de soros de cães. O método utilizado foi o de soroaglutinação microscópica, com os seguintes sorovares de leptospira como antígenos: *copenhageni*, *canicola*, *pomona*, *grippotyphosa*, *guidae*, *sawagizak*, *wolffi*, *australis*, *bataviae*, *brasiliensis*, *castellonis*, *panama*, *pyrogenes*, *javanica*, *autumnalis*, *butembo* e *patoc*. Das amostras analisadas, 14% foram reagentes, com títulos que variaram de 1:200 a 1:12.800, com predominância para o sorotipo *icterohaemorrhagiae* (75%). Houve também evidências sorológicas para os sorovares *canicola*, *pomona*, *tarassovi*, *sejroe*, *australis*, *bataviae* e *pyrogenes*.

Santa Rosa et al. (1974) realizaram estudo sorológico em cães da cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, na busca do índice de infecção por leptospiros. Empregaram bateria de 21 sorovares, utilizando a prova de soroaglutinação microscópica, no período compreendido de setembro de 1966 a julho de 1968, em soros de 136

animais clinicamente sadios de ambos os sexos e idades variadas. Foram considerados positivos aqueles cães com títulos de anticorpos séricos maiores ou iguais a 1:200, sendo encontradas oito amostras positivas (5,9% dos soros amostrados). Observou-se que quatro animais foram reagentes com títulos de anticorpos que variaram de 1:200 a 1:1.600 contra o sorovar *icterohaemorrhagiae*, dois, com títulos de 1:200 e 1:400 contra o *tarassovi*, um, com título de 1:800 contra o *pomona* e um com título de 1:200 contra para o *pyrogenes*. Portanto, pelo menos, 5,9% dos cães entraram em contato com leptospiros. Os autores ressaltam, também, a não-obtenção de sorologia positiva para o sorovar *canicola*.

Ryu (1976) descreveu a realização do teste de soroaglutinação microscópica em soros de 12.374 cães sob cuidados veterinários, 480 cães domiciliados e 1.855 cães errantes, em 24 países do mundo, com amostras de sangue armazenadas em papel de filtro e encaminhadas ao laboratório do autor, entre os anos de 1970 e 1973. Utilizou, como antígenos, dez cepas de sorovares de *Leptospira interrogans*: *icterohaemorrhagiae*, *canicola*, *autumnalis*, *hebdomadis*, *australis*, *pomona*, *pyrogenes*, *grippotyphosa*, *bataviae* e *javanica*. Todos os soros foram testados somente para os dois primeiros sorovares e uma parte deles, para os 10 sorovares descritos. A prevalência de anticorpos contra os sorovares *icterohaemorrhagiae* e *canicola* nos cães sob cuidados veterinários, procedentes do Brasil, foi de 7,7%, com nove reagentes para *icterohaemorrhagiae*, dois para *canicola* e 35 para ambos. No mundo todo, 12,4% daqueles sob cuidados veterinários haviam sido vacinados, 6,5% resultaram positivos e 91,0%, negativos. Em todos os países participantes do levantamento sorológico, 1,1% dos soros foram positivos para *icterohaemorrhagiae*, 0,5% para *canicola* e 8,0% para ambos os sorovares. As taxas de anticorpos aos dois sorovares, nos continentes foram: América do Sul (1,1%), Ásia (10,1%), Europa (3,4%), América do Norte (2,4%), Oceania e África/Etiópia (0%). No grupo de

cães sob atendimento veterinário, que apresentavam anticorpos aos sorovares *icterohaemorrhagiae* e *canicola*, houve aproximadamente a relação de dois machos para uma fêmea e de 1,5 vezes o número de doentes sobre os sadios.

Caldas et al. (1977) conduziram uma pesquisa de aglutininas antileptospíricas em 430 cães da cidade de Salvador, Bahia, Brasil, empregando a prova de soroaglutinação microscópica e utilizando uma bateria de antígenos constituída pelos sorovares *icterohaemorrhagiae*, *wolffi*, *tarassovi*, *canicola*, *australis*, *andamana*, *pyrogenes*, *javanica*, *pomona*, *castellonis*, *autumnalis*, *celledoni*, *panama*, *bataviae* e *brasiliensis*. Constataram frequências maiores para os sorovares *icterohaemorrhagiae* (22,79%), *canicola* (20,59%), *castellonis* (10,29%) e *pyrogenes* (9,56%) dos 93 animais reagentes, com títulos maiores ou iguais a 1:100. Observaram que os animais sem raça definida foram os mais acometidos, pelo fato de permanecerem por mais tempo na rua e estarem, portanto, mais expostos a fatores de riscos. Os maiores índices de animais reagentes ocorreram nas áreas mais pobres em relação à higiene básica.

Na Ilha de Trindad, um estudo envolvendo 96 cães errantes para o diagnóstico da leptospirose, por meio da técnica de soroaglutinação microscópica (SAM), perante uma bateria de antígenos de 12 sorovares (*ballum*, *canicola*, *pyrogenes*, *copenhageni*, *bataviae*, *grippotyphosa*, *fort-bragg*, *georgia*, *tarassovi*, *panama*, *javanica*, *shermani*) e considerando como positivos aqueles com título a partir de 1:100, revelou que 55% dos animais testados foram reagentes para *Leptospira* spp. Destes, 21 animais para *L. canicola*, 16 para *L. copenhageni*, oito para *L. pyrogenes*, três para *L. hebdomadis*, três para *L. tarassovi*, um para *L. autumnalis* e um para *L. grippotyphosa*. (EVERARD et al., 1979).

Em Moreno, Província de Buenos Aires, Argentina, um

grupo de 143 cães foi testado por aglutinação microscópica e 73 deles foram soropositivos, sendo a maioria para o sorovar *canicola* (37%), *pyrogenes* (4,8%) e *autumnalis* (2%) (MYERS, 1980).

Yasuda et al. (1980b) utilizando a técnica de soroaglutinação microscópica para o diagnóstico da leptospirose em cães errantes da cidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, analisaram 1.428 amostras de soro, colhidas no período compreendido entre outubro de 1976 e setembro de 1977. Os sorovares utilizados para a prova sorológica foram: *icterohaemorrhagiae*, *canicola*, *pomona*, *grippytyphosa*, *tarassovi*, *australis*, *bataviae*, *ballun*, *wolffi*, *panama*, *pyrogenes*, *javanica*, *autumnalis*, *butembo*, *andamana*, *shermani*, *whitcombi* e *brasiliensis*. Foram denominados de soropositivos aqueles que apresentaram aglutinação na diluição igual ou superior a 1:100. Considerou-se a positividade do soro correspondente ao sorovares de leptospira com o qual se obteve maior título e os que apresentavam dois ou mais sorovares com títulos máximos coincidentes foram eliminados. Dos 1.428 soros, 308 (21,6%) foram reagentes, dos quais, 38 apresentavam coaglutinações com títulos máximos coincidentes. Observou-se que 50,7% foram reagentes para o sorovar *canicola*, 25,5% para o sorovar *icterohaemorrhagiae* e, seguindo-se em ordem decrescente: *grippytyphosa*, 7,8%; *pomona*, 6,7%; *ballun*, 4,4%; *pyrogenes*, 1,8%; *autumnalis*, 1,8%; *andamana*, 0,7% e finalmente *butembo*, 0,4%. As diferenças na prevalência da leptospirose ocorridas no verão e outono foram estatisticamente significantes em relação as ocorridas na primavera e inverno. Portanto, a leptospirose canina sofreu influência sazonal, no verão e no outono se encontrou maior número de cães com sorologia positiva. A frequência de soros com aglutininas antileptospiras nesses cães, distribuídas por regiões, não apresentou diferenças significantes.

Em outro estudo, ainda na Cidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, Yasuda et al. (1980a), no período de 1976 a 1977,

selecionaram casualmente 1.415 cães para o isolamento de leptospiros dos rins desses animais. Foram isoladas 35 amostras, dentre as quais encontraram o sorovar *canicola* como o mais freqüente em 32 amostras. Duas amostras foram positivas para o sorovar *copenhageni* e uma para o *pomona*.

Farrington & Sulzer (1982), em uma pesquisa realizada em Porto Rico, de julho a agosto de 1980, utilizando soro de 116 cães de rua para a prova de soroaglutinação microscópica, revelaram a alta prevalência de animais reagentes para o sorogrupo Icterohaemorrhagiae (72,6% dos 73 soropositivos), seguido dos sorogrupos Andamana (8,2%) e Pyrogenes (4,2%), com títulos que variaram de 1:100 a 1:12.800. A diferença nas porcentagens de infecções em machos e fêmeas não foi estatisticamente significativa. Quanto à idade dos animais, houve diferença significativa, sendo que os animais com mais de um ano apresentaram maior número de reações. Os autores ressaltaram que a alta prevalência de anticorpos contra o sorogrupo Icterohaemorrhagiae entre a população canina se deu, primariamente, à transmissão da doença de rato para cão e de cão para cão.

Cordeiro & Sulzer (1983) isolaram da urina de um cão com sinais clínicos compatíveis com leptospirose, o sorovar *copenhageni*, no Estado de Minas Gerais, Brasil.

Morales et al. (1990) realizaram um trabalho com o intuito de divulgar dados sobre a freqüência da leptospirose canina, diagnosticada no Hospital Veterinário da FCAVJ/UNESP/Jaboticabal-SP, Brasil. Durante os anos de 1986 a 1990 foram diagnosticados clinicamente e confirmados, por intermédio da prova de soroaglutinação microscópica, 88 casos da enfermidade junto aos ambulatórios do Hospital Veterinário da referida faculdade (28 cães vacinados e sessenta não vacinados). Mais de 50% dos casos foram verificados em cães com

idade entre 2 e 5 anos. O número de casos da doença em machos foi de sessenta, enquanto 28 ocorreram em fêmeas. O sorotipo de *L. interrogans* mais diagnosticado sorologicamente foi o *canicola*, em 45 amostras de soro sangüíneo. O sorotipo *icterohaemorrhagiae* foi o segundo mais freqüente com 36 amostras de soros reagentes, seguido pelos sorovares *pomona* e *grippotyphosa*.

Prescott et al. (1991), em Ontário, Canadá, pela técnica de soroaglutinação microscópica (SAM), detectaram 39,2% de soropositividade a partir da titulação 1:100 para leptospirose em 474 cães. Evidenciaram a maioria dos títulos para os sorovares *canicola* e *icterohaemorrhagiae* (26,2%) e uma pequena proporção reagiu para os sorovares *bratislava* (8,2%), *autumnalis* (3,8%), *pomona* (3,2%), *hardjo* (3,0%) e *grippotyphosa* (1,9%).

Van Den Broek et al. (1991), estudando 511 cães urbanos não vacinados para leptospirose, em clínicas de Edinburgh e Glasgow (Reino Unido), encontraram soroprevalência de anticorpos antileptospiras em 61/260 (23,5%) e 69/251 (27,5%) dos animais respectivamente; além do sorovar *canicola* que apresentou a maior freqüência, os sorovares *icterohaemorrhagiae*, *ballum*, *copenhageni*, *bratislava*, *javanica* e *hardjo*. No mesmo estudo, concluíram que os cães machos foram os mais acometidos, principalmente os de idade compreendida entre dois e quatorze anos.

Como o clima quente e seco não é ideal para a sobrevivência da leptospira no meio ambiente, Myburgh et al. (1993) relatam que esta pode ser a razão da baixa prevalência da leptospirose em um estudo realizado em quatrocentos cães na área de Pretória, África, durante o período de um ano (1989-1990), quando somente 1,5% desses cães foram reagentes, sendo cinco reações contra o sorovar *tarassovi* e duas contra o *pyrogenes*. Para essa pesquisa foi utilizada a técnica de

soroaglutinação microscópica com os seguintes sorovares como antígenos: *canicola*, *copenhageni*, *grippotyphosa*, *hardjo*, *mini*, *pomona*, *pyrogenes* e *tarassovi*. Consideraram-se, nesse caso, como amostras positivas, aquelas com título maior ou igual a 1:160, inconclusivas, aquelas com título igual a 1:80 e negativas as com título abaixo de 1:80.

Um estudo realizado na Austrália por Dickeson & Love (1993), em animais de várias espécies, mostrou a prevalência de anticorpos contra o sorovar *copenhageni* em cães e em cavalos. A prova de soroaglutinação microscópica foi utilizada com a participação de oito sorovares (*australis*, *canicola*, *copenhageni*, *grippotyphosa*, *hardjo*, *pomona*, *tarassovi* e *zanoni*). Foram considerados reagentes todos os animais que apresentaram títulos iguais ou superiores a 1:50. Dos 501 cães submetidos ao exame, 49 apresentaram título, sendo a maioria das reações contra o sorovar *copenhageni*, seguido, em ordem decrescente, contra os sorovares *gripptyphosa*, *pomona*, *tarassovi*, *zanoni*, *canicola* e *australis*.

Estudando casos agudos de leptospirose em cães e animais contactantes, Scanziani et al. (1994), na Itália, encontraram evidências sorológicas para o sorovar *bratislava* como o mais freqüente e em ocorrência menor para o sorovar *grippotyphosa*. Os autores ressaltam que esses dois sorovares diferem daqueles tipicamente encontrados em cães, normalmente *canicola* e *icterohaemorrhagiae*.

Ratnam et al. (1994); Thirunavukkarasu et al. (1995) relatam, em seus trabalhos, surtos de leptospirose canina na Índia, dando destaque para os sinais clínicos como pirexia, anemia, icterícia, diarreia e emese. Esses autores realizaram exames laboratoriais pelo método de soroaglutinação microscópica e observaram índices de positividade de 16,3% e 17,19%, respectivamente, principalmente para os sorovares *canicola*, *icterohaemorrhagiae*, *autumnalis* e *pomona*.

Na cidade de Rosário, na Argentina, 260 amostras de soro foram analisadas pela técnica de microaglutinação. Desses soros, 58,07% foram reagentes, sendo a maior parte contra o sorovar *canicola* seguido, em ordem decrescente de prevalência, pelos sorovares *copenhageni*, *castellonis*, *pyrogenes* e *pomona* (BRIHUEGA et al., 1995).

Em Nova Jersey e Michigan, nos EUA, de 1990 a 1995, em 17 cães doentes, os sorovares mais prevalentes foram: *pomona*, em 12 animais, *grippotyphosa* em oito e *autumnalis* em seis cães (HARKIN & GARTRELL, 1996).

Pineda et al. (1996) analisaram 60 amostras de soro de cães, atendidos em uma Universidade do Chile, escolhidos aleatoriamente, sem distinção de raça, idade e sexo, por meio da prova de soroaglutinação microscópica, utilizando 12 sorovares como antígenos. As reações mais freqüentes foram contra os sorovares *canicola* e *pyrogenes*, isto é, dos 23 animais reagentes (títulos $\geq 1:100$), 17,39% reagiram para o sorovar *canicola* e 13,04% para o *pyrogenes*; 12 apresentaram coaglutinações. Em relação à idade dos animais, a maior porcentagem de positivos ficou entre os seis e 45 meses e nenhum animal abaixo de seis meses apresentou reação. Por outro lado, a maior porcentagem de cães positivos entre seis e 45 meses de idade apresentou títulos baixos (1:100), sendo os títulos de 1:500 mais freqüentes em animais maiores de 46 meses. Ao considerar o sexo do animal, existiu uma diferença significativa em favor dos machos (78,26%), sobre as fêmeas (21,73%), no número de indivíduos afetados. Os autores ressaltam que a epidemiologia da doença pode variar de acordo com a ocorrência dos sorovares diferentes daqueles que geralmente afetam os cães, como mostra o aparecimento do sorovar *pyrogenes*. Nesse trabalho não se observou título para o sorovar *icterohaemorrhagiae*.

Weekes et al. (1997), em Barbados, na Índia,

selecionaram dois grupos de cães, sendo o primeiro de animais abandonados (78) e o segundo de animais suspeitos de leptospirose aguda (61). No primeiro grupo, observaram-se 48 animais reagentes, com títulos maiores ou iguais a 1:100, sendo as reações contra o sorogrupo *Autumnalis* as mais freqüentes (45%), seguidas por reações contra os sorogrupos *Icterohaemorrhagiae* e *Australis* (16% cada um) e *Pomona* (13%). No segundo grupo, verificou-se a prevalência de 75% de animais com títulos superiores ou iguais a 1:100, com predominância do sorogrupo *Icterohaemorrhagiae*, seguido pelo sorogrupo *Australis*.

Com o objetivo de levantar a prevalência e determinar os principais fatores de risco à leptospirose canina na área urbana do município de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil, Furtado et al. (1997) realizaram um estudo por amostragem aleatória por conglomerados, coletando-se amostras de sangue de 260 cães e aplicando-se formulários epidemiológicos. Essas amostras sangüíneas foram submetidas ao exame sorológico (SAM) e como antígenos foram empregados os seguintes sorovares: *andamana*, *autumnalis*, *castellonis*, *canicola*, *grippothyphosa*, *copenhageni*, *icterohaemorrhagiae* e *pyrogenes*. Das 260 amostras de soro canino, 75 (28,9%) foram reagentes, com títulos maiores ou iguais a 1:100 para um ou mais sorovar. Destas, 18 coaglutinaram para um ou mais sorotipos. Foram encontradas evidências sorológicas para os sorovares *canicola* (37,33%), *icterohaemorrhagiae* (24,00%) *andamana* (9,33%), *pyrogenes* (4,00%) e *autumnalis* (1,33%). Com relação aos inquéritos, os cães que viviam em pátio sem muro teriam mais chances de contrair a infecção, provavelmente devido ao contato com outros cães. Na questão referente ao destino do esgoto, cães que viviam em residências que não estavam ligadas à rede pública de esgoto estariam mais propensos a adquirir a doença, em relação aos outros cães, provavelmente devido ao contato com água contaminada proveniente de fossas ou valetas. A terceira questão, referente ao

confinamento do cão, revelou que os animais que permaneciam confinados tinham menos chances de adquirir a doença, provavelmente porque esses animais não tinham contato com cães estranhos e com o ambiente externo. Quando a prevalência foi avaliada levando-se em consideração a distribuição espacial na área urbana do município, foram observadas diferenças significativas relacionadas à presença de indústrias alimentícias e engenhos beneficiadores de grãos, conseqüentemente, em razão dos resíduos, maior número de roedores. Em outras questões analisadas, como sexo, idade, raça e presença de roedores, não houve diferenças estatisticamente significativas. Também não houve associação quando se avaliou presença de roedores, por serem o mesmo muito comum, perdendo dessa forma o poder estatístico.

Em 36 cães com leptospirose, no norte do estado de Nova York, EUA., os títulos de aglutininas antileptospíricas encontrados foram predominantemente para os sorovares *grippotyphosa* (59%) e *pomona* (26%), seguidos, em menor freqüência, pelos sorovares *canicola*, *icterohaemorrhagiae*, *hardjo* e *autumnalis* (BIRNBAUM *et al.*, 1998). O sorovar *grippotyphosa* foi diagnosticado em um alarmante número de cães nos EUA (LEPTOSPIROSIS, 1998).

Steger-Lieb *et al.* (1999), na Suíça, verificaram cães com títulos de anticorpos antileptospiras para *L. grippotyphosa*, *L. pomona*, *L. bratislava*, *L. australis*, *L. icterohaemorrhagiae* e *L. canicola*, alertando para a presença de animais reagentes a outros sorovares, além dos contidos nas vacinas comerciais.

Flores *et al.* (1999) coletaram sangue de 135 cães de rua, na Cidade do México, México, para realização da prova de aglutinação microscópica, a fim de detectar de anticorpos antileptospiras. Houve reação em 52 amostras de soro e os sorovares *L. castellanis*, *L. canicola*, *L. icterohaemorrhagiae* e *L. pyrogenes* foram os mais comumente

encontrados. Os autores ressaltam que esses animais colaboram para a ocorrência da leptospirose entre a população canina e, conseqüentemente, representam um risco para a saúde pública.

Com o objetivo de avaliar os níveis de aglutininas antileptospíricas em cães no município de Patos, Paraíba, Brasil, Alves et al. (2000) analisaram, por meio da técnica de soroaglutinação microscópica, 114 amostras de soro sanguíneo de cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal da Paraíba, com ou sem quadro clínico de leptospirose. Utilizaram uma bateria de antígenos vivos, contendo 24 sorovares (*australis*, *grippotyphosa*, *butembo*, *autumnalis*, *cynopteri*, *icterohaemorrhagiae*, *panama*, *pomona*, *hardjo*, *canicola*, *wolffi*, *pyrogenes*, *bratislava*, *castellonis*, *bataviae*, *whitcombi*, *hebdomadis*, *copenhageni*, *javanica*, *shermani*, *tarassovi*, *andamana*, *patoc*, *sentot*) e considerou-se como animal reagente aquele que apresentou título igual ou superior a 1:100. Do total de 114 amostras, 23 foram reagentes para os sorovares *australis*, *autumnalis*, *butembo*, *cynopteri*, *grippotyphosa*, *hardjo*, *icterohaemorrhagiae*, *panama*, *pomona*, *pyrogenes* e *wolffi*. Nesse trabalho, verificou-se a prevalência de sorovares diferentes dos achados clássicos, nos quais prevalecem os sorotipos *canicola* e *icterohaemorrhagiae*. Os autores concluíram também que os maiores índices de animais reatores foram provenientes da periferia, fato que poderia estar associado, particularmente, aos problemas de infraestrutura, como coleta irregular de lixo, problemas de saneamento básico e presença de cães vadios e sem controle.

Jouglard & Brod (2000) realizaram um estudo com a finalidade de conhecer a prevalência e fatores de risco à leptospirose em cães no meio rural do município de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. Analisaram 489 amostras de sangue de cães, pelo método laboratorial de soroaglutinação microscópica (SAM), com antígenos vivos, utilizando 24 sorovares. Dessas amostras, 13 foram consideradas reagentes, com

títulos de anticorpos que variaram de 1:50 a 1:800, contra os sorovares *icterohaemorrhagiae*, *australis*, *copenhageni*, *pyrogenes*, *sentot* e *canicola*, adotando-se, em casos de coaglutinações, o título mais alto. Dos fatores de risco avaliados, o contato com açude, com banhado, a altitude e a variação do pH, mostraram-se significativos estatisticamente. Outros fatores, como faixa etária, sexo e confinamento não apresentaram significância estatística.

Com a finalidade de avaliar a ocorrência de evidências sorológicas de leptospirose entre a população canina de centro urbano do município amazônico de Oriximiná, Pará, Brasil, Lilenbaum et al. (2000) efetuaram um experimento com 185 amostras de sangue de cães escolhidos randomicamente. Para o diagnóstico sorológico, utilizou-se o método de soroaglutinação microscópica com antígenos vivos, os quais foram: *australis*, *autumnalis*, *bratislava*, *castellonis*, *bataviae*, *canicola*, *hebdomadis*, *icterohaemorrhagiae*, *copenhageni*, *pomona* e *wolffi*. A fim de identificar o mais provável sorovar infectante, considerou-se a positividade de um soro para o sorovar em que se observou a aglutinação mais evidente. Do total de amostras realizadas, 34 (18,4%) mostraram-se reativas, com título mínimo de 1:100 e as reações mais freqüentemente encontradas foram contra os sorotipos *icterohaemorrhagiae* (10,3%), *copenhageni* (4,9%) e *canicola* (3,2%).

Com o objetivo de se determinar a freqüência de aglutininas antileptospíricas em cães errantes da cidade de Salvador, Bahia, Brasil, e de identificar as áreas de maior risco, Viegas et. al. (2001) coletaram 120 amostras de sangue de cães errantes provenientes de vários distritos sanitários da cidade. A técnica empregada foi soroaglutinação microscópica, com 16 sorovares de leptospiros (*wolffi*, *pyrogenes*, *castellonis*, *grippotyphosa*, *canicola*, *autumnalis*, *icterohaemorrhagiae*, *tarassovi*, *bataviae*, *panama*, *pomona*, *celledoni*, *australis*, *javanica*, *butembo* e *shermani*). Consideraram como reagentes

aqueles que apresentaram título maior ou igual a 1:100. Os sorovares de maior ocorrência encontrados nos distritos sanitários foram *autumnalis*, *canicola*, *icterohaemorrhagiae* e *australis*. Não houve ocorrência de aglutinação com os sorovares *javanica*, *celledoni* e *butembo*. Os maiores títulos encontrados foram para os sorovares *canicola* (1:3200), *autumnalis* (1:1600), e *panama* (1:1600).

Uma pesquisa sorológica para leptospirose em diversos Estados brasileiros, envolvendo várias espécies animais, inclusive a canina, foi realizada por Favero et al. (2002). A técnica utilizada foi a de soroaglutinação microscópica, com uma coleção de antígenos vivos que incluiu 24 variantes sorológicas de leptospiros patogênicas e duas de leptospiros saprófitas. Foram analisadas 938 amostras sangüíneas de cães, considerando como reagentes aquelas amostras que apresentaram título maior ou igual a 1:100. Dentre os animais que apresentaram duas ou mais variantes sorológicas com títulos diferentes, considerou-se como o mais provável o sorovar que apresentou maior título e, quando havia títulos idênticos, foram excluídos da análise e considerados como reatores para *Leptospira* spp. As variantes mais freqüentes para a espécie canina foram os sorovares *copenhageni* e *icterohaemorrhagiae*, no Estado de São Paulo e *pyrogenes*, no Piauí. Ressalta-se, todavia, que na atualidade, o sorovar *copenhageni* tem sido o mais freqüentemente isolado em casos de leptospirose em seres humanos no Estado de São Paulo (SAKATA et al., 1992), sugerindo a participação de roedores sinantrópicos como fonte comum tanto para humanos como para os cães.

Com o objetivo de avaliar o potencial zoonótico da população canina do município de Santana do Parnaíba, São Paulo, Brasil, com relação à leptospirose, Masculli et al. (2002) conduziram um experimento durante a campanha de vacinação anti-rábica animal de 1999, com a colheita de 410 amostras de soro de cães e o preenchimento de um questionário pelos proprietários dos animais, a fim de traçar um

perfil epidemiológico da população e proceder à análise estatística dos fatores de riscos. Foi empregada a técnica de microaglutinação microscópica (SAM), com uma bateria de 24 variantes sorológicas de leptospirosas vivas. Foi encontrado positividade de 15%, com maior frequência das variantes *copenhageni* (24%), *canicola* (16%) e *hardjo* (16%). As comparações entre os valores sorológicos positivos para leptospirose e os dados extraídos dos questionários aplicados demonstraram significância com relação ao fator de risco idade, uma vez o aparecimento da doença foi muito mais freqüente em animais com idade superior a um ano. Com relação aos outros parâmetros analisados, como tipo de confinamento, presença de roedores e enchentes, bem como áreas de alagamentos, os autores relatam que a ausência de correlação observada nesse estudo pode ter ocorrido em razão do pequeno número de casos positivos, perdendo, dessa forma, o poder estatístico.

Costa et al. (1985) relataram o caso de um homem de 32 anos de idade, no qual foi estabelecido o diagnóstico de leptospirose por *L. australis*. Na tentativa de pesquisar a cadeia epidemiológica, armaram duas ratoeiras no quintal da residência do paciente. Dois ratos foram capturados e não estavam contaminados com leptospirosas. Colheram, também, amostras de sangue dos quatro cães da residência para realização de exame de soroaglutinação. Dois, dos quatro cães, apresentaram resultado negativo, um apresentou positividade para *L. icterohaemorrhagiae*, com título 1:100 e o cão de maior estima do paciente mostrou título de 1:800 para *L. australis*. Estabeleceu-se a cadeia epidemiológica com precisão atribuindo-se a fonte da doença ao cão. Era o animal preferido de seu dono que freqüentemente o afagava.

Ocorreu um surto de leptospirose em Madras, na Índia, onde 48 humanos, de 95 testados, apresentaram-se soropositivos. Dentre eles, 32 reagiram contra o sorovar *icterohaemorrhagiae*. Das 94 amostras de soro de cães testados, 20 foram positivas, 10 reagiram contra o

sorovar *icterohaemorrhagiae* e nove contra o sorovar *canicola*. Os murinos também foram testados e uma grande porcentagem de soropositivos para o sorovar *icterohaemorrhagiae* foi encontrada (VENKATARAMAN & NEDUNCHELLIAN, 1992).

Em um estudo em humanos, na Baixada Santista, São Paulo, Brasil, Pregnotatto et al. (2000) observaram a ocorrência do sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* como sendo o mais freqüente e, em seguida, o sorogrupo *Autumnalis*. Os autores sugerem que a maior incidência do sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* obedece ao padrão estadual, pois está associado aos murinos, que são disseminadores constantes de leptospira. Já o sorogrupo *Autumnalis* está relacionado com animais silvestres, os quais, com a proximidade Mata Atlântica, devem ter sido adaptados aos animais domésticos ou mesmo à população murina, passando a infectar os homens.

Realizou-se um levantamento soroepidemiológico na cidade de Londrina, Paraná, Brasil, para leptospirose, em 49 pessoas consideradas como não expostas a riscos, 75 trabalhadores de limpeza pública, 55 indivíduos com atividade em ambiente hospitalar e 29 trabalhadores do Departamento de Água e Esgoto. Como antígenos foram utilizados 23 sorovares de leptospirosas vivas e a pesquisa de aglutininas antileptospirosas foi realizada pela reação de soroaglutinação microscópica. A reação foi considerada positiva a partir de 1:200. No total de 208 soros examinados, 28,4% apresentaram reação positiva. O grupo dos trabalhadores de limpeza pública foi o que demonstrou mais alto grau de positividade (46,7%). Nos trabalhadores do setor de água e esgoto, a positividade foi de 28,55%. Nos indivíduos com atividades em laboratório, encontrou-se uma positividade de 21,8%. Naqueles indivíduos cuja atividade foi considerada sem riscos, observou-se uma positividade de 20,2%, que pode ser explicada pela contaminação com leptospirosas em atividades recreativas ou mesmo pelo contato com animais, como o cão

(VASCONCELOS et al., 1992).

É de suma importância a necessidade do diagnóstico laboratorial não somente para a confirmação dos casos clínicos como, também, para identificar animais portadores, determinar a extensão do problema e desenvolver medidas de controle da doença (SANTA ROSA, 1970).

O teste de soroaglutinação microscópica (SAM) é o de eleição para o diagnóstico sorológico da leptospirose, em todo o mundo (OLIVEIRA, 1999; VENKATARAMAN et al., 1992) e é considerado com padrão de referência no Brasil (BRASIL, 1995). Essa prova, altamente sensível, determina o sorovar envolvido e não reconhece a presença do agente, mas sim da resposta imunológica do hospedeiro infectado. Além disso, não indica se a infecção é ativa (KEE et al., 1994).

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Tendo em vista a importância do estudo da leptospirose em cães, não só pela gravidade da enfermidade no animal como também pela sua importância em Saúde Pública, o presente trabalho teve por objetivo:

1) Avaliar a frequência de cães sorologicamente reagentes para leptospirose na área territorial urbana de 32km² do município de Botucatu-SP.

2) Verificar a distribuição da frequência de cães sorologicamente reagentes para leptospirose, em 20 postos de vacinação da área territorial urbana do município de Botucatu-SP.

3) Verificar a frequência de cães reagentes para *Leptospira* spp., correlacionando-a com os seguintes fatores predisponentes ambientais e de criação:

- Acesso à rua;
- Contato com roedores;
- Residência não ligada à rede pública de esgoto.

4) Determinar quais são os sorovares envolvidos na infecção dos cães por leptospirose na área territorial de Botucatu-SP e as respectivas titulações frente aos 24 sorovares testados.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização do município de Botucatu-SP

O município de Botucatu localiza-se na região Centro-Sul do Estado de São Paulo (22,88583° latitude sul e 48,445° longitude oeste), está cerca de 805 metros acima do mar e possui uma área territorial de 1.483km², dos quais 1.329km² correspondem à zona rural e 154km² à zona urbana. Possui uma população estimada de 108.306 habitantes. O clima é subtropical úmido, temperatura média de 19°C, com invernos secos, verões quentes e precipitação pluviométrica em torno de 1.250mm. A vegetação consiste de mata pluvial e cerrado (IBGE, 2000).

4.2 Padronização da amostragem

Durante a 33.^a campanha anual de vacinação anti-rábica, no município de Botucatu-SP, em 2001, coordenada pela Disciplina de Planejamento em Saúde Animal e Saúde Pública da FMVZ/UNESP/Botucatu-SP, em conjunto com a Prefeitura Municipal, foram colhidas mil amostras de sangue de cães (EPIINFO 2000), aproximadamente 6% do total de 16.838 cães vacinados, em vinte postos de vacinação, representativos do total de quarenta postos distribuídos geográfica e homogeneamente, em cinco regiões da área territorial urbana de 32km² do município. A área de abrangência de cada posto foi, em média, de 0,8km².

4.3 Alocação dos animais e dos postos

Para o procedimento de alocação do animal (2.º estágio), foi considerado o plano de amostragem sistemática sob critério de que, a partir do animal selecionado, os dois seguintes seriam descartados. Quanto aos postos de colheita, procedeu-se, em 1.º estágio, ao sorteio (amostragem casual) geográfico de 20 postos de vacinação. O tamanho amostral, 1.000 cães, foi determinado considerando a taxa de 10% de erro de estimação, com nível de 95% de confiança (COCHRAN, 1977).

4.4 Questionário aplicado ao proprietário do cão

Para cada amostra de sangue colhida, realizou-se um questionário com o proprietário do cão, a fim de obter as características de criação e do ambiente, as quais estão apresentadas no QUADRO 1, a seguir:

QUADRO 1 - Questionário aplicado aos proprietários dos cães submetidos ao exame de soroaglutinação microscópica (SAM)

Identificação do Animal (tubo):	Dia: ____/____/____	Posto: ____
Proprietário: _____		
Endereço:	Rua/Avenida: _____ n.º _____, Bairro: _____, Tel: _____, CEP: ____-____	
Última dose de vacina contra leptospirose em: 1999 2000 2001 Mês: _____		
Tem acesso à rua: Sim Não		
Tem contato com roedores: Sim Não		
A residência está ligada à rede pública de esgoto: Sim ☐ Não		

4.5 Colheita das amostras

4.5.1 Sangue

Durante os cinco dias da campanha de vacinação, no mês de agosto do ano de 2001, foram colhidas de 1.000 cães, pela punção das veias cefálica ou jugular, amostras de aproximadamente 10 ml de sangue, em tubo de vidro estéril (Vacutainer), com capacidade de 15ml. Em seguida, as amostras foram enviadas ao laboratório de Diagnóstico de Zoonoses da FMVZ/UNESP/Botucatu-SP, onde foram dessoradas (após a retração do coágulo) e centrifugadas a 1.613g, durante dez minutos. Após esse procedimento, foram acondicionadas em microtubos de plástico de 1,5 mililitros do tipo Eppendorf (devidamente identificados e numerados, relacionando a amostra ao animal, ao posto e ao inquérito) mantidas em freezer, a 20°C negativos, para realização das provas de soroaglutinação microscópica (SAM).

4.6 Procedimento Laboratorial

4.6.1 Meios de cultura

As cepas-padrão dos 24 sorovares utilizadas foram, inicialmente, cultivadas em meio semi-sólido de Fletcher (ANEXO 1) e, em seguida, mantidas por repiques semanais em meio líquido de Ellinghausen – EMJH (ANEXO 2).

4.6.2 Antígenos

Foram utilizadas como antígenos para a prova de aglutinação microscópica as culturas de cepas-padrão de 24 sorovares de *Leptospira* spp. (QUADRO 2), mantidas por repiques semanais em meio líquido de EMJH, a 29°C. Só foram usadas como antígenos culturas de 4 a 14 dias, que não apresentavam contaminantes e nem auto-aglutinação.

QUADRO 2 - Sorovares mantidos em meio de cultura líquido de EMJH com albumina bovina "Tween 80", no Laboratório de Zoonoses da FMVZ/UNESP/Botucatu-SP, para utilização na prova de SAM

SOROGRUPO	SOROVAR
Australis	<i>australis</i>
	<i>bratislava</i>
Autumnalis	<i>autumnalis</i>
	<i>butembo</i>
Ballum	<i>castellonis</i>
Bataviae	<i>bataviae</i>
	<i>brasilienses</i>
Canicola	<i>canicola</i>
Celledoni	<i>whitcombi</i>
Cynopteri	<i>cynopteri</i>
Djasiman	<i>djasiman</i>
	<i>sentot</i>
Grippotyphosa	<i>grippotyphosa</i>
Hebdomadis	<i>hebdomadis</i>
Icterohaemorrhagiae	<i>icterohaemorrhagiae</i>
	<i>copenhageni</i>
Javanica	<i>javanica</i>
	<i>pomona</i>
Panama	<i>panama</i>
Pyrogenes	<i>pyrogenes</i>
Sejroe	<i>hardjo</i>
	<i>wolffi</i>
Shermani	<i>shermani</i>
	<i>tarassovi</i>

4.6.3 Prova de Soroaglutinação Microscópica (SAM)

Nos dias de prova, as culturas usadas como antígeno eram diluídas em solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril de pH 7,6 na proporção de 1:2. Com o auxílio de alça bacteriológica, transferia-se uma gota de cada diluição para lâmina de microscopia tamanho 26X76 milímetros, examinando-se, sem lamínula, em microscópio de campo escuro. Considerava-se como concentração satisfatória, quando a suspensão preenchia todo o campo microscópico, com fina camada de leptospiros individualizadas.

A prova de soroaglutinação microscópica constituiu-se de duas fases, a de triagem e a de titulação.

4.6.3.1 Triagem

O soro de cada amostra era diluído colocando-se 0,1ml de soro para 4,9ml de solução PBS estéril de pH 7,6 em um tubo de Wassermann pequeno, perfazendo uma proporção de 1: 50.

Em microplaca de polietileno, com fundo em forma de U, devidamente identificada e marcada, pipetava-se nos compartimentos 50 microlitros do soro diluído, formando uma linha. O número de compartimentos preenchidos era de 24 para cada amostra de soro. Fazia-se o mesmo para o controle, onde em vez de soro, era colocada solução salina tamponada com fosfato (PBS) de pH 7,6.

Acrescentavam-se, nos respectivos compartimentos, inclusive nos respectivos controles, 50µl das correspondentes suspensões antigênicas, passando a diluição final em cada um desses compartimentos para 1:100. Importante citar que o sorovar e a

identificação do cão ficavam devidamente anotados na microplaca, com um pincel atômico, deixando claro qual a amostra que estava sendo testada e para qual sorovar.

Agitava-se a microplaca levemente e deixava-se repousar em estufa a 37°C, por 1 hora.

Ao final desse tempo, colocava-se, com o auxílio de uma alça bacteriológica, uma gota do conteúdo de cada compartimento, formando uma linha, sobre uma lâmina de microscopia.

Em seguida, examinava-se, sem lamínula, em microscópio de campo escuro, com óleo de imersão entre a lâmina e o condensador, e observava-se na objetiva de 10X e ocular de 10X a 15X.

Observava-se o grau de aglutinação das leptospiros.

Foi estabelecido o grau de aglutinação das leptospiros em uma variação indo desde negativo (sem aglutinação) até quatro cruces, para cada antígeno testado, tendo como referência o respectivo controle:

- Negativo: ausência de aglutinação, com número de leptospiros livres iguais ao controle;
- 1+: presença de aglutinação, com 75% de leptospiros livres em relação ao controle;
- 2+: presença de aglutinação, com 50% de leptospiros livres em relação ao controle;
- 3+: presença de aglutinação, com 25% das leptospiros livres em relação ao controle;
- 4+: presença de aglutinação, com menos de 25% de leptospiros livres em relação ao controle.

Aqueles soros que, nessa prova, aglutinaram um número igual ou maior do que 50% das leptospiras (2+, 3+, 4+) foram encaminhados para a titulação, realizando-se a prova somente com os sorovares reagentes.

4.6.3.2 Titulação

Os soros separados para a realização de titulação foram diluídos com os antígenos reagentes à triagem.

A partir da diluição de 1:50 utilizada na prova da triagem, realizavam-se mais seis diluições dos soros ou quantas fossem necessárias, consecutivas e ao dobro (títulos de 1:100 a 1:3.200).

Microplacas com colunas de seis compartimentos eram preparadas: uma coluna para cada antígeno, de acordo com o resultado de cada soro.

À parte, em cada compartimento, era preparado o controle de cada antígeno.

Eram colocados 100µl de soro diluído (1:50) em cada compartimento da primeira linha (o número de compartimentos de cada linha era de acordo com o número de antígenos testados), o que corresponderia, mais tarde, à diluição 1:100. Nos demais compartimentos das outras linhas, eram colocados 50 microlitros de PBS de pH 7,2.

Para se obter a diluição desejada, retiravam-se com a micropipeta 50µl de soro diluído do primeiro compartimento (primeira linha), passando para o segundo (correspondente ao mesmo sorovar, na segunda linha). Após homogeneizar o segundo compartimento, retirava-se cinquenta microlitros deste e passava-se para o terceiro, fazendo o mesmo até o último compartimento. Depois de homogeneizado, eram desprezados cinquenta microlitros. No final, todos os compartimentos

apresentavam cinqüenta microlitros de mistura, na proporção de 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, ..., etc., em cada coluna. Esse procedimento era feito para todas as colunas.

O antígenos correspondentes (50µl) eram distribuídos a cada compartimento da respectiva coluna e ao controle (nesta etapa, as diluições de cada linha de soro duplicavam).

Misturava-se, incubava-se e fazia-se a leitura conforme descrito para a prova de triagem.

Considerava-se como ponto final de reação a mais alta diluição de soro que era capaz de aglutinar 50% ou mais das leptospiras em relação ao controle. O título de aglutininas do soro foi expresso pela recíproca da diluição.

Todo trabalho laboratorial foi realizado nas dependências do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da FMVZ/UNESP/Botucatu-SP, nos laboratórios da Disciplina de Zoonoses e Disciplina de Planejamento de Saúde Animal e Saúde Pública.

4.7 Análise Estatística*

As informações coletadas foram armazenadas no banco de dados da planilha EXCEL e seus valores observados apresentados em tabelas contendo as distribuições freqüenciais. Para a discussão da associação entre duas variáveis-resposta considerou-se o teste de Goodman (GOODMAN, 1964, 1965) para contrastes entre e dentro de populações multinomiais. Em relação à taxa de positividade, estabeleceu-

* Consultor: Prof. Titular Carlos Roberto Padovani – Disc. de Bioestatística do Instituto de Biociências – UNESP- Botucatu

se, para a discussão dos resultados, os limites de 95% de confiança para a proporção de positividade (STREINER & NORMAN, 1994).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

O resultado obtido a partir das amostras de soro canino, colhidas durante a campanha de vacinação, no ano de 2001, na área territorial urbana do município de Botucatu-SP, submetidas à técnica de soroaglutinação microscópica (SAM) aplicada à leptospirose, considerando como animais reagentes ou positivos aqueles que apresentaram títulos iguais ou superiores a 1:100, está representado na TABELA 2.

TABELA 2 - Resultado sorológico antileptospírico dos cães amostrados, na área territorial urbana de Botucatu, São Paulo, Brasil, 2001

Resultado	N.º Cães	%
Reagente	179	17,90
Não Reagente	821	82,10
Total	1.000	100,00

Do total de 1.000 cães amostrados, 179 foram reagentes para leptospirose, isto é, a amostra revelou 17,9% de positividade ($p < 0,0001$). O intervalo de confiança da ocorrência de *Leptospira* spp. nos cães, na área territorial urbana de Botucatu-SP, ficou entre os limites de 15,52% e 20,28%.

O resultado sorológico para leptospirose foi confrontado com os seguintes fatores predisponentes ambientais e de criação, levantados a partir do questionário respondido pelos proprietários dos cães: acesso do animal à rua (TABELA 3), contato com roedores (TABELA 4) e com residência não à rede pública de esgoto (TABELA 5).

TABELA 3 - Distribuição do resultado sorológico antileptospírico dos cães amostrados, em relação ao acesso do animal à rua ou não, segundo informações dos seus donos, na área territorial urbana de Botucatu, São Paulo, Brasil, 2001

Cães	Reagentes	Não Reagentes	Total
Tem acesso à rua	93 (22,14%)	327 (77,86%)	420 (42,00%)
Não tem acesso à rua	86 (14,83%)	494 (85,17%)	580 (58,00%)
	179 (17,90%)	821 (82,10%)	1.000 (100,00%)

Dos 420 cães que têm acesso à rua, 93 (22,14%) foram reagentes e apresentaram, estatisticamente, diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos cães reagentes que não têm acesso à rua.

TABELA 4 - Distribuição do resultado sorológico antileptospírico dos cães amostrados, em relação ao contato com roedores ou não, segundo informações dos seus donos, na área territorial urbana de Botucatu, São Paulo, Brasil, 2001

Cães	Reagentes	Não Reagentes	Total
Tem contato com roedores	72 (23,68%)	232 (76,32%)	304 (30,40%)
Não tem contato com roedores	107 (15,50%)	589 (84,50%)	696 (69,60%)
	179 (17,90%)	821 (82,10%)	1.000 (100,00%)

Dos 304 animais que têm contato com roedores, 72 (23,68%) foram reagentes e mostraram-se significativos estatisticamente ($p < 0,05$) em relação aos cães reagentes que não tiveram contato com roedores.

TABELA 5 - Distribuição do resultado sorológico antileptospírico dos cães amostrados, de acordo com residência ligada a rede pública de esgoto ou não, segundo informações dos seus donos, na área territorial urbana de Botucatu, São Paulo, Brasil, 2001

Cães	Reagentes	Não Reagentes	Total
Residência ligada à rede pública de esgoto	173 (18,10%)	783 (81,90%)	956 (95,60%)
Residência não ligada à rede pública de esgoto	6 (13,63%)	38 (86,37%)	44 (4,40%)
	179 (17,90)	821 (82,10%)	1.000 (100,00%)

Estatisticamente, os cães reagentes e que vivem em residências ligadas à rede pública de esgoto (18,10%) foram os mais reativos, porém, não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$), em relação aos cães também reagentes que vivem em residências que não são ligadas à rede pública de esgoto (13,63%).

Os 20 postos de vacinação trabalhados foram numerados de 1 a 20 (FIGURA 1). O número de cães submetidos ao exame de soroaglutinação em cada posto, a localização do posto e o respectivo número de reagentes estão representados na TABELA 6 .

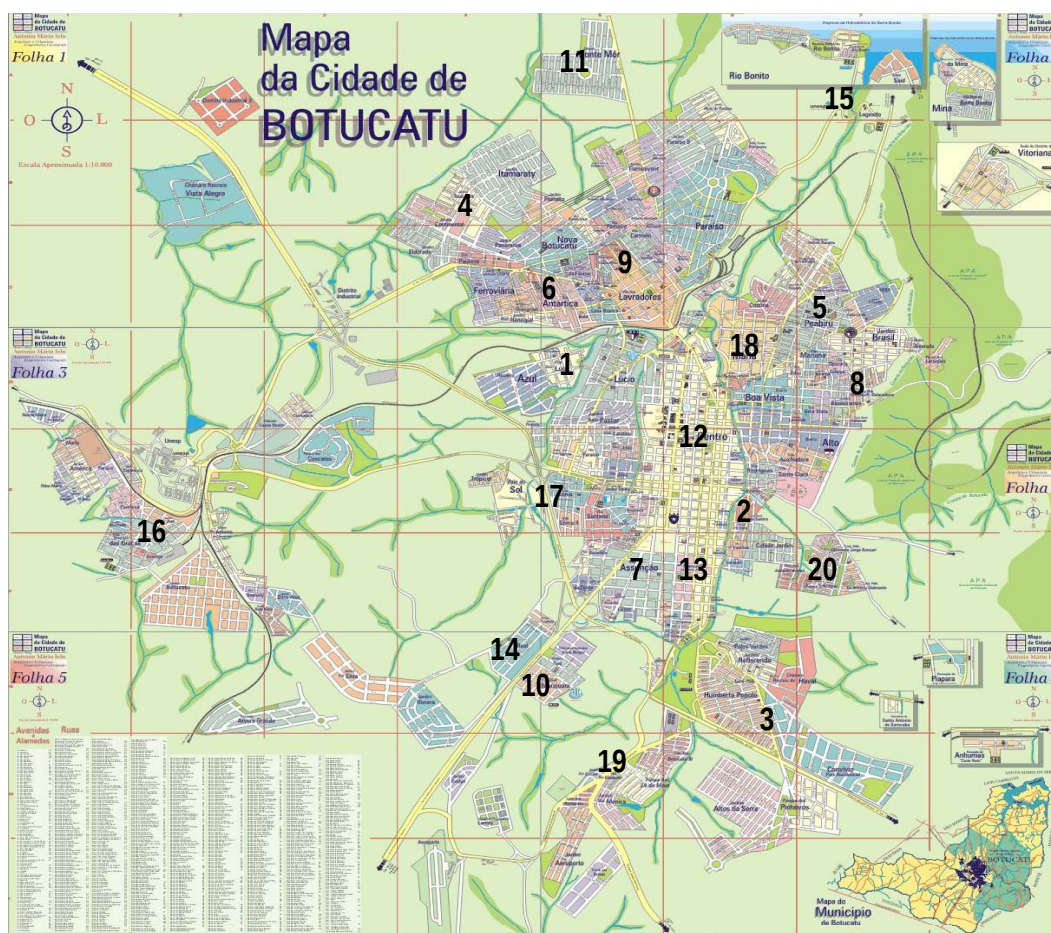


FIGURA 1 - Mapa da área territorial urbana de Botucatu-SP, com demarcação dos vinte postos onde se realizaram as colheitas

TABELA 6 – Distribuição do resultado da soroaglutinação microscópica (SAM) antileptospírica em cães, em 20 postos de colheita, na área territorial urbana de Botucatu, São Paulo, Brasil, 2001

Posto	<i>Leptospira</i> spp.		Total (%)
	Reagente (%)	Não Reagente (%)	
P1* * Vila São Luís	19 (44,19%) F*	24 (55,81%)	43 (4,30%)
P2 Jardim São Vicente	15 (34,88%) EF	28 (65,12%)	43 (4,30%)
P3 COHAB-I	16 (31,37%) DE	35 (68,63%)	51 (5,10%)
P4 Jardim Continental	15 (31,25%) DE	33 (68,75%)	48 (4,80%)
P5 Jardim Peabiru	13 (26,00%) CDE	37 (74,00%)	50 (5,00%)
P6 Vila Antártica	13 (19,70%) BCD	53 (80,30%)	66 (6,60%)
P7 Vila Assunção	11 (18,33%) BC	49 (81,67%)	60 (6,00%)
P8 Vila Operária	9 (18,00%) BC	41 (82,00%)	50 (5,00%)
P9 Vila dos Lavradores	7 (17,07%) ABC	34 (82,93%)	41 (4,10%)
P10 Parque Marajoara	8 (16,00%) ABC	42 (84,00%)	50 (5,00%)
P11 Jardim Monte Mor	8 (15,69%) ABC	43 (84,31%)	51 (5,10%)
P12 Centro	5 (13,89%) AB	31 (86,11%)	36 (3,60%)
P13 Vila Santa Teresinha	7 (13,21%) AB	46 (86,79%)	53 (5,30%)
P14 Vila Real	7 (12,73%) AB	48 (87,27%)	55 (5,50%)
P15 Lageado	5 (10,00%) AB	45 (90,00%)	50 (5,00%)
P16 Rubião Júnior	5 (9,80%) AB	46 (90,20%)	51 (5,10%)
P17 Vila Sônia	5 (9,80%) AB	46 (90,20%)	51 (5,10%)
P18 Vila Maria	4 (8,00%) AB	46 (92,00%)	50 (5,00%)
P19 Parque 24 de Maio	4 (7,84%) AB	47 (92,16%)	51 (5,10%)
P20 COHAB – V	3 (6,00%) A	47 (94,00%)	50 (5,00%)
	179 (17,90%)	821 (82,10%)	1.000 (100,00%)

* As letras expressas após os índices dos reagentes de cada posto demonstraram se há ou não diferença estatística entre os postos, em relação à positividade. Os postos que apresentam pelo menos uma letra em comum não revelam diferença estatística significativa ($p > 0,05$), já os que não apresentam nenhuma letra em comum são considerados estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

* * Postos onde foram realizadas as colheitas de sangue.

Os postos apresentaram desde 6,00% até 44,19% de positividade. Os resultados revelam que houve diferença estatística em relação a positividade entre os postos.

Com relação à vacinação contra leptospirose dos cães amostrados, a TABELA 7 mostra o número de cães vacinados que apresentaram soropositividade, bem como para quais sorovares, e indicando também o período da aplicação da vacina.

TABELA 7 - Dinâmica sorológica antileptospírica em cães vacinados, de acordo com o período da vacinação contra a leptospirose, segundo informantes, na área territorial urbana de Botucatu, São Paulo, Brasil, 2001

Período	Nº. cães	Sorovar (título)	Total (%)
Há 6 meses	1	<i>castellonis</i> (1:100)	2 (1,92%)
	1	<i>pyrogenes</i> (1:100)	
Há 5 meses	1	<i>castellonis</i> (1:100)	1 (0,96%)
Há 3 meses	1	<i>canicola</i> (1:200), <i>pyrogenes</i> (1:200) <i>icterohaemorrhagiae</i> (1:100)	1 (0,96%)
Agosto	1	<i>autumnalis</i> (1:800)	2 (1,92%)
	1	<i>castellonis</i> (1:100)	
Reagentes sem informação exata do mês	1	<i>autumnalis</i> (1:200)	4 (3,85%)
	1	<i>castellonis</i> (1:100)	
	1	<i>castellonis</i> (1:100), <i>canicola</i> (1:100), <i>pyrogenes</i> (1:100)	
	1	<i>panama</i> (1:100)	
Não reagentes	94	-	94(90,39%)
	104	-	104(100,00%)

Em 2001, dos cães amostrados, 104 foram vacinados contra leptospirose e somente 10 foram reagentes. Dos animais reagentes, três estavam dentro do período de três meses que antecederam a colheita de sangue, dentre os quais, somente um apresentou reações para os sorovares existentes na vacina, *canicola* e *icterohaemorrhagiae*.

Foram observados casos de coaglutinação em que mais de uma variante sorológica apresentou titulação para uma mesma amostra de sangue. A fim de identificar o mais provável sorovar infectante, considerou-se a positividade de um soro para o sorovar em que se observou maior titulação (TABELA 8).

TABELA 8 - Distribuição dos títulos antileptospíricos máximos em cães, frente a 24 sorovares testados, na área territorial urbana de Botucatu, São Paulo, Brasil, 2001

Sorovar	Títulos de anticorpos (UI)							Total(%)
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1.600	1:3.200	1:6.400	
<i>castellonis</i>	8	8	12	9	2	-	-	39 (28,68%)
<i>autumnalis</i>	9	6	4	6	1	-	-	26 (19,12%)
<i>pyrogenes</i>	4	4	6	6	3	1	-	24 (17,65%)
<i>icterohaemorrhagiae</i>	9	1	4	1	-	-	-	15 (11,03%)
<i>canicola</i>	2	3	2	1	-	2	3	13 (9,56%)
<i>australis</i>	2	1	2	1	-	-	-	6 (4,41%)
<i>shermani</i>	-	-	-	-	-	3	2	5 (3,68%)
<i>copenhageni</i>	-	-	2	-	-	-	-	2 (1,47%)
<i>grippotyphosa</i>	1	-	-	-	-	1	-	2 (1,47%)
<i>brasiliensis</i>	1	-	-	-	-	-	-	1 (0,73%)
<i>butembo</i>	-	1	-	-	-	-	-	1 (0,73%)
<i>panama</i>	1	-	-	-	-	-	-	1 (0,73%)
<i>wolffi</i>	-	1	-	-	-	-	-	1 (0,73%)
	37	25	32	24	6	7	5	136 (100,00%)

O sorovar *castellonis* foi o que apresentou maior número de reações (39), seguido pelos sorovares *autumnalis* (26), *pyrogenes* (24), *icterohaemorrhagiae* (15), *canicola* (13), *australis* (6), *shermani* (5), *grippotyphosa* e *copenhageni* com duas reações para cada um e *butembo*, *brasiliensis*, *panama* e *wolffi* com uma reação para cada sorovar. Os sorovares *whitcombi* do sorogrupo Celledoni e o sorovar

cynopteri do sorogrupo *Cynopteri* não reagiram para nenhuma das amostras.

Em algumas situações, os casos de coaglutinações apresentaram títulos máximos idênticos para dois ou mais sorovares. Nesses casos, as coaglutinações foram apresentadas separadamente, uma vez que não foi possível estabelecer o sorovar infectante mais provável (TABELA 9).

TABELA 9 - Distribuição dos títulos máximos de coagulações antileptospíricas em cães, ocorridas na prova de soroaglutinação microscópica (SAM), na área territorial urbana de Botucatu, São Paulo, Brasil, 2001

Sorovar	Títulos de anticorpos (UI)								Total (%)
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1.600	1:3.200	1:6.400	1:12.800	
<i>castellonis/canicola</i>	3	5	5	1	-	1	2	-	17 (39,54%)
<i>canicola/pyrogenes</i>	1	1	2	2	-	-	-	-	6 (13,96%)
<i>castellonis/pyrogenes</i>	-	-	-	2	1	-	-	-	3 (6,98%)
<i>castellonis/canicola/pyrogenes</i>	1	-	-	-	1	-	-	-	2 (4,65%)
<i>castellonis/icterohaemorrhagiae</i>	1	1	-	-	-	-	-	-	2 (4,65%)
<i>canicola/icterohaemorrhagiae</i>	1	-	-	1	-	-	-	-	2 (4,65%)
<i>icterohaemorrhagiae/pyrogenes</i>	2	-	-	-	-	-	-	-	2 (4,65%)
<i>australis/shermani</i>	-	-	-	1	-	-	-	-	2 (4,65%)
<i>australis/castellonis/canicola/pyrogenes/icterohaemorrhagiae/shermani</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	1 (2,33%)
<i>australis/hebdomadis/copenhageni</i>	-	1	-	-	-	-	-	-	1 (2,33%)
<i>autumnalis/grippotyphosa</i>	-	1	-	-	-	-	-	-	1 (2,33%)
<i>autumnalis/hebdomadis</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	1 (2,33%)
<i>autumnalis/icterohaemorrhagiae</i>	-	-	1	-	-	-	-	1	1 (2,33%)
<i>castellonis/canicola/copenhageni</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (2,33%)
<i>castellonis/canicola/hardjo</i>	-	-	9	1	-	-	2	-	1 (2,33%)
Total	11	9	9	8	2	1	2	1	43 (100,00%)

As coaglutinações com títulos menores e que , portanto, não foram consideradas como o provável sorovar infectante, estão representadas na TABELA 10.

TABELA 10 - Distribuição de todas reações com títulos antileptospíricos menores ocorridos em cães, frente a 24 sorovares testados, na área territorial urbana de Botucatu, São Paulo, Brasil, 2001

Sorovar	Títulos de anticorpos (UI)						Total(%)
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1.600	1:3.200	
<i>icterohaemorrhagiae</i>	17	12	3	3	-	-	35 (20,47%)
<i>canicola</i>	7	10	8	3	-	-	28 (16,37%)
<i>pyrogenes</i>	11	5	2	1	2	-	21 (12,28%)
<i>copenhageni</i>	7	10	2	-	-	-	19 (11,11%)
<i>castellonis</i>	1	5	7	3	-	1	17 (9,94%)
<i>australis</i>	3	3	-	1	1	1	9 (5,26%)
<i>shermani</i>	1	3	2	-	1	2	9 (5,26%)
<i>grippotyphosa</i>	2	4	-	-	-	-	6 (3,51%)
<i>hebdomadis</i>	4	1	-	-	1	-	6 (3,51%)
<i>djasiman</i>	3	1	1	-	-	-	5 (2,92%)
<i>autumnalis</i>	-	2	-	-	1	-	3 (1,75%)
<i>panama</i>	3	-	-	-	-	-	3 (1,75%)
<i>pomona</i>	3	-	-	-	-	-	3 (1,75%)
<i>javanica</i>	1	1	-	-	-	-	2 (1,17%)
<i>wolffi</i>	1	1	-	-	-	-	2 (1,17%)
<i>bratislava</i>	1	-	-	-	-	-	1 (0,58%)
<i>sentot</i>	1	-	-	-	-	-	1 (0,58%)
<i>hardjo</i>	-	1	-	-	-	-	1 (0,58%)
<i>butembo</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>bataviae</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>brasiliensis</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>whitcombi</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>cynopteri</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>tarassovi</i>	-	-	-	-	-	-	-
	66	59	25	11	6	4	171 (100,00%)

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Do total de amostras analisadas, 179 mostraram-se reativas, com título mínimo de 1:100, o que corresponde a 17,9% dos animais testado - $p < 0,0001$ - (TABELA 2), revelando frequência média em relação a outros estudos realizados em várias localidades do Brasil e do mundo. Veronesi et al. (1956), na cidade de São Paulo, São Paulo, Brasil e Santa Rosa et al. (1974), na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, encontraram taxas de positividade bem menores, 9,6% e 5,9%, respectivamente, mesmo considerando como reagentes aqueles com título igual ou superior a 1:200. Santa Rosa et al. (1969-1970), em um estudo no Instituto Biológico de São Paulo, São Paulo, Brasil, durante nove anos, encontraram 14% de animais reagentes, com título igual ou superior a 1:200. Mascolli et al. (2002), em um estudo similar a este, no município de Santana de Parnaíba, São Paulo, Brasil encontraram 15% de positividade e utilizaram em sua bateria de 24 antígenos duas variantes sorológicas saprófitas.

Ainda conforme a Tabela 2, taxas de prevalência dentro do intervalo de confiança de positividade do presente estudo ($15,52 < \text{reagentes} < 20,28$) foram observadas por Alves et al. (2000), no município de Patos, Paraíba, Brasil, com 20% de animais reagentes e por Lilenbaum et al. (2000), no município amazônico de Oriximiná, Pará, Brasil, com 18,4% de cães soropositivos. Em ambos estudos, utilizaram-se baterias de antígenos com 24 sorovares, porém, com duas variantes saprófitas, diferindo-se, dessa forma, do presente trabalho .

Incidências mais altas foram encontradas por Caldas et al. (1977), na cidade de Salvador, Bahia, Brasil, com 21,62% de positividade, por Yasuda et al. (1980b), na cidade de São Paulo, São Paulo, Brasil,

com 21,57% de reagentes e por Furtado et al. (1997), na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil, com uma frequência de 28,9% de cães soropositivos para leptospirose. Nos três casos, foram denominados como reagentes aqueles soros que apresentaram aglutinação na diluição igual ou superior a 1:100, porém, com menor número de sorovares utilizados para a realização da prova de soroaglutinação microscópica em comparação com o presente estudo.

Com relação a outros países, verifica-se também uma grande diversidade de taxas de soroprevalência da leptospirose em cães.

Frequência bastante baixa foi relatada na área de Pretória, África, onde somente 1,5% de cães reagiram contra sorovares de leptospira em um estudo realizado por Myburgh et al. (1993). Os autores atribuem esse baixo percentual ao clima quente e seco, que desfavorecem a manutenção do agente no meio ambiente, o que difere do clima na cidade de Botucatu-SP.

Aproximaram-se do resultado de positividade apresentado neste trabalho, os apresentados na Índia, por Ratnam et al. (1994) e Thirunavukkarasu et al. (1995), que observaram índices de 16,3% e 17,19%, respectivamente. Nesses dois estudos foram utilizadas sete variantes sorológicas de leptospira, dificultando, dessa forma, a comparação e discussão com os resultados aqui apresentados.

Altas incidências foram relatadas por Farrington & Sulzer (1982), com 62,90% de positividade, em Porto Rico, por Weekes et al. (1997), com 62,00% em cães abandonados, na Índia, por Everard et al. (1979), com 55%, em Trindade e por Pineda et al. (1996), com 38,30%, no Chile. A positividade no México foi descrita por Flores et al. (1999), com 38,51% e no Reino Unido, por Van Den Broek et al. (1991), com 23,5% e 27,5%, nas cidade de Edinburg e Glasgow, respectivamente. Em todos esse trabalhos citados houve uma diferença no número de

sorovares utilizados na prova de soroaglutinação e até mesmo na tipo da amostra em relação a este estudo.

As pesquisas de levantamento sorológico de títulos de anticorpos antileptospíricos em cães mostram a grande variabilidade quanto à frequência tanto no Brasil, quanto no exterior. Esses diferentes resultados em pesquisas semelhantes podem ser explicados pela variedade de fatores que influenciam no ocorrência da leptospirose. Incluem-se entre esses fatores, para exemplificar, o índice pluviométrico, a temperatura e a presença de receptáculos naturais de água, que foram citados por Szyfres (1976), bem como as condições sanitárias e de infraestrutura em que esses animais são criados (GENOVEZ, 1996). A diversidade de sorovares utilizados, das características amostrais, bem como das maneiras de interpretação do exame laboratorial também podem, de certa forma, contribuir na diferença da apresentação dos resultados, dificultando a comparação e a discussão.

Com relação aos fatores predisponentes ambientais e de criação, confirmou-se relação estatística de causa e efeito entre a presença de roedores (TABELA 3) e o acesso à rua (TABELA 4). Normalmente, os roedores estão associados à ocorrência de casos da doença, pois se comportam como portadores permanentes de leptospirosas, contaminando o ambiente, constituindo-se, dessa forma, numa fonte perene de infecção tanto para o cão como para outras espécies, inclusive o homem (SANTA ROSA et al., 1980).

Os resultados de Furtado et al. (1997) e Masculli et al. (2002), diferem dos resultados deste trabalho, com relação à presença de roedores, mas estes relatam que o fator de risco pode ser considerado como não adequadamente avaliado, devido ao fato de ser completamente contra o esperado, uma vez que a presença de ratos está intimamente

ligada ao aparecimento da doença. Relatam, ainda, que os proprietários, muitas vezes, ocultam fatos importantes que consideram indesejáveis.

Furtado et al. (1997) também encontraram a associação de animais positivos para leptospirose com o acesso à rua, observando que cães não confinados teriam 2,61 vezes mais chances de adquirir a doença, discordando dos achados de Mascolli et al. (2002), que não encontraram diferença estatística significativa.

Na questão referente ao destino do esgoto da residência (TABELA 5), era esperado que cães que viviam em residências não ligadas à rede pública de esgoto teriam mais chances de adquirir a doença, devido ao maior contato com água contaminada proveniente de fossas e valetas, como foi demonstrado no trabalho realizado por Furtado et al. (1997). No entanto, no presente estudo, apesar da resposta esperada, não foi possível estabelecer essa relação.

A distribuição do resultado da soroaglutinação microscópica em vinte postos de colheita, distribuídos homogeneamente na área territorial urbana do município de Botucatu-SP (TABELA 6), revelou índices de positividade de 6,00% até 44,19%. Essas diferenças podem ser explicadas pelo fato de que certas regiões apresentam condições mais favoráveis para a manutenção do agente no meio ambiente, ou ainda, que o modo de criação dos animais de determinado local propicia a infecção de cães por leptospira.

Houve uma preocupação quanto à interpretação errônea dos resultados sorológicos, nesta pesquisa, em relação a título de anticorpos vacinais. Dessa forma, para sanar a dúvida, foi associada ao inquérito a questão sobre a vacinação do animal (TABELA 7). O número de cães vacinados contra leptospirose foi de 104 (10,40%) em 2001. Dentro desse grupo, apenas 10 foram reagentes (0,10%) e destes, 3 cães (0,03%) estavam dentro do intervalo em que a vacina poderia interferir no

resultado da prova de soroaglutinação microscópica (SAM). Porém, somente um cão (0,01%) apresentou reações aos sorovares existentes nas vacinas (*canicola* e *icterohaemorrhagiae*). Portanto, o índice de cães vacinados e reagentes não prejudicou a interpretação dos resultados.

Em geral, cães desenvolvem títulos antileptospíricos entre 1:100 e 1:400 em resposta à vacina contra leptospirose, que normalmente não persistem por mais de três meses. Entretanto alguns cães desenvolvem altos títulos como o de 1:3.200, depois da vacinação. Esses títulos altos podem persistir por até seis meses (BOLIN, 1996).

A distribuição dos sorovares (TABELA 8), quando se desconsiderou a possibilidade de infecção por mais de um sorovar em um mesmo animal, escolhendo-se como infectante o sorovar de maior título, mostra maior importância para os sorovares *castellonis* (28,68%), *autumnalis* (19,12%), *pyrogenes* (17,65%), *icterohaemorrhagiae* (11,03%), *canicola* (9,56%), *australis* (4,41%) e *shermani* (3,68%).

O sorovar *castellonis* também foi o que apresentou maior porcentagem de evidências sorológicas (50%) no estudo realizado por Flores et al. (1999), na Cidade do México, México. A pesquisa conduzida por Caldas et al. (1977) também revelou a importância do sorovar *castellonis*, sendo o terceiro mais freqüente no estudo.

É importante ressaltar que Veronesi et al. (1956), Ryu (1976), Yasuda et al. (1980b), Myburgh et al. (1993) e Dickeson & Love (1993) são exemplos de autores que não incluíram nas baterias de antígenos de seus estudos o sorovar *castellonis*, impossibilitando dessa maneira o aparecimento de evidências sorológicas para tal sorovar.

O *autumnalis* teve sua prevalência mais relevante que os sorovares classicamente encontrados. Isso também ocorreu na avaliação dos níveis de aglutininas antileptospiras em cães no município de Patos,

Paraíba, Brasil, realizada por Alves et al. (2000), sendo o sorovar de maior destaque, com prevalência de 34,78% das reações. A frequência desse sorovar foi menor no presente estudo em relação a pesquisa citada, porém, os resultados de ambas pesquisas estão de acordo no sentido da importância dele na espécie canina.

O sorovar *pyrogenes* merece atenção especial por aparecer em terceiro lugar, com 17,65% de frequência. Foi isolado do rato d'água (*Nectomys squamipes*) no Brasil por Santa Rosa et al. (1980). PINEDA et al. (1996) relatam a importância desse sorovar num estudo realizado no Chile, aparecendo em segundo lugar, ocupando 13,04% do total das reações. Outros estudos também demonstram, em menor frequência, sorologicamente, a infecção dos cães por esse sorovar de leptospira, indicando, dessa forma, a presença desse agente no meio ambiente (SANTA ROSA et al., 1969-1970; SANTA ROSA et al., 1974; YASUDA et al., 1980; FARRINGTON & SULZER, 1982; MYBURGH et al., 1993; FURTADO et al., 1997 e ALVES et al., 2000).

Em relação aos sorovares *icterohaemorrhagiae* e *canicola*, que são relatados como os mais associados a espécie canina (Bolin, 1996; Alves et al., 2000), observamos que houve evidências sorológicas para ambos, porém, desta vez, não como os sorovares mais frequentes, ou pelo menos com um deles sendo mais frequente, como observamos nos achados de Veronesi et al. (1956), Santa Rosa et al. (1969-1970), Caldas et al. (1977), Yasuda et al. (1980a), Morales et al. (1990), Van de Broek et al. (1991) e de Furtado et al. (1997). Mesmo não sendo os mais prevalentes neste estudo, continuam sendo de suma importância na epidemiologia da doença, pois estão presentes nos resultados da maioria das pesquisas e estão bastante associados à leptospirose canina.

Em casos que ocorreram coaglutinações com títulos máximos não foi possível identificar o sorovar infectante e foram representadas na tabela 9. Na tabela 10 estão representadas todas as reações sorológicas com títulos menores, que não foram portanto, considerados como os prováveis sorovares infectantes. Ambas foram apresentadas no presente estudo para não haver ocultação de resultados.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

1. A taxa de positividade do exame sorológico antileptospírico dos cães, na área territorial urbana de 32km² do município de Botucatu-SP foi de 17,9% ($p < 0,0001$).

2. Os cães que têm acesso à rua foram os mais reagentes (22,14% - 93/420), com significância estatística ($p < 0,05$) em relação aos cães que não tem acesso à rua (14,83% - 86/494).

3. Os cães que têm contato com roedores foram os mais reagentes (23,68% - 72/304), com significância estatística ($p < 0,05$) em relação aos cães que não têm contato com roedores (15,50% - 107/696).

4. Animais reagentes que vivem em residências ligadas à rede pública de esgoto (18,10% - 173/956) não demonstrou significância estatística ($p > 0,05$) em relação aos animais reagentes que vivem em residências não ligadas à rede pública de esgoto (13,63% - 6/44).

5. Distribuição do resultado da soroaglutinação microscópica (SAM) antileptospírica em cães, em vinte postos de colheita, na área territorial urbana de Botucatu mostrou que há associação de positividade entre alguns postos, compreendendo postos com 6% a 44,19% de ocorrência de *Leptospira* spp.

6. Na dinâmica sorológica antileptospírica em cães vacinados contra a leptospirose, somente dez dos cães vacinados foram reagentes, três estavam dentro do período de três meses que antecederam a colheita de sangue, dentre os quais, somente um apresentou reações para os sorovares existentes na vacina comercial (*canicola* e *icterohaemorrhagiae*).

7. Dos 24 sorovares testados, a distribuição dos títulos máximos antileptospíricos em cães revelou positividade para os sorovares *castellonis* (28,68%), *autumnalis* (19,12%), *pyrogenes* (17,65%), *icterohaemorrhagiae* (11,03%), *canicola* (9,56%), *australis* (4,41%), *shermani* (3,68%), *grippotyphosa* (1,47%) e *copenhageni* (1,47%) *butembo* (0,73%), *brasiliensis* (0,73%), *panama* (0,73%), e *wolffi* (0,73%)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ALVES, C.J.; ANDRADE, J.S.L.; VASCONCELLOS, S.A.; MORAIS, Z.M.; AZEVEDO, S.S.; SANTOS, F.A. Avaliação dos níveis de aglutininas anti-leptospira em cães no município de Patos - PB, Brasil. **Rev. Bras. Cienc. Vet.**, Niterói, v. 7, p. 17-21, 2000.

ANDRE-FONTAINE, G.; GANIERI, J.P. New topics on leptospirosis. **Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.**, Exeter, v. 13, p. 163-168, 1990.

BARANTON, G. DNA relatedness of serovars. [Online] Prepublication list. Unité de Bactériologie Moléculaire et Médicale. Institut Pasteur. [Citado em 01/12/1998]. Leptospira Molecular Biology Home Page. Paris: Institut Pasteur, 2002. Disponível em <<http://www.pasteur.fr/recherche/leptospira/leptospira.html>>. Acesso em 20. mar. 2002.

BIRNBAUM, N.; BARR, S.C.; CENTER, S.A; SCHERMERHORN, T.; RANDOLPH, J.F.; SIMPSON, K.W. Naturally acquired leptospirosis in 36 dogs: serological and clinicopathological features. **J. Small Anim. Pract.**, Oxford, v. 39, p. 231-236, 1998.

BLOOD, D. C.; RADOSTITS, O. M. Doenças causadas por bactérias-V. In: BLOOD, D.C. **Clínica Veterinária**. 7 Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. Cap. 20, p. 637-646.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 22p.
BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

BOLIN, C.A. Diagnosis of leptospirosis: A reemerging disease of companion animals. **Semin. Vet. Med. Surg. Small Anim.**, Philadelphia, v. 11, p. 166-171, 1996.

BRASIL. Ministério da saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais peçonhentos. **Manual de Leptospirose**. 2. ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1995. 98p.

BRIHUEGA, B.; HUTTER, E.; LABALLEN, H. Serological study of leptospirosis in dogs in the town of Rosario, Argentina. **Vet. Argent.**, Buenos Aires, v. 12, p. 720-724, 1995.

CALDAS, E.M., DORIA, J.D., MARTINS, M.A. Immunological inquiry for the epidemiology of leptospirosis in canis *familiaris* in Salvador, Bahia, Brazil. **Int. J. Zoonoses**, Taipei Taiwan, v. 4, p. 103-110, 1977.

COCHRAN, W. Sampling techniques. 3 ed. New York : John Wiley, 1977, 55p.

CORDEIRO, F., SULZER, C.R. *Leptospira interrogans*, serovar *copenhageni*, isolated from a dog in Belo Horizonte, Brazil. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v. 14, p. 38-41, 1983.

CORRÊA, W.M., CORRÊA, C.N.M. Leptospiroses. In: **Enfermidades infecciosas dos animais domésticos**. 2. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992. p.219-232a.

CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.N.M. *Leptospira canina*. In: **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992. p.233-240b.

COSTA, P.D., GISMONDI, R.C., NETO, B.A.S. Leptospirose por *Leptospira australis*. **Arq. bras. Med.**, Rio de Janeiro, v. 59, p. 321-322, 1985.

DICKESON, D.; LOVE, D.N. A serological survey of dogs, cats and horses in south-eastern Australia for leptospiral antibodies. **Aust. Vet. J.**, Brunswick, v. 70, p.389-390, 1993.

ELLISON, R.S.; HILBINK, F. Leptospiral infections in New Zealand dogs. **Surveillance**, Wellington, v.17, n.2, p.45-46, 1990.

EVERARD, C.O.R., CAZABON, E.P.I., DREESEN, D.W., SULZER, C.R. Leptospirosis in dogs and cats on the Island of Trinidad: West Indies. **Int. J. Zoonoses**, Taipei Taiwan, v. 6, p. 33-40, 1979.

FAINE, S. **Guidelines for the control of leptospirosis**. Geneva: World Health Organization, 1982. 171 p. (Who off set publication, 67).

FARRINGTON, N.P., SULZER, K.R. Canine leptospirosis in Puerto Rico. **Int. J. Zoonoses**, Taipei Taiwan, v. 9, p. 45-50, 1982.

FAVERO, A.C.M.; PINHEIRO, S.R.; VASCONCELOS, S.R.; MORAIS, Z.M.; FERREIRA, F.; NETO, J.S.F. Sorovares de leptospirosas predominantes em exames sorológicos de bubalinos, ovinos, caprinos, eqüinos, suínos e cães de diversos estados brasileiros. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v.32, n.4, p.613-9, 2002.

FLORES, A.R.; RIOL, M.A.R.; BADILLO, M.L.O.; MOCTEZUMA, A.P. Seroprevalencia de leptospirosis en perros callejeros del norte de la ciudad de México. **Vet. Méx.**, v. 30, p. 105-7, 1999.

FURTADO, L.R.I.; FEHLBERG, M.F.B.; AVILA, M.O.; TEIXEIRA, M.M.; ROSADO, R.L.I.; MARTINS, L.F.S.; BROD, C.S. Prevalência e avaliação de fatores de risco à leptospirose canina, no município de Pelotas, RS. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.64, n.1, p.57-61, jan/jun., 1997.

GENOVEZ, M.E. Leptospirose em cães. **Pet. Vet.**, v.1, n.1, p.6-9, mar./abr., 1996

GÍRIO, R.J.S. Ocorrência de surtos de leptospirose suína e humana em três propriedades do município de Viradouro - SP. **Ciênc. Vet.**, Jaboticabal, v.1, n.2, p.24-25, 1987.

GÍRIO, R.J.S. Estudo da possível influência da leptospirose sobre determinadas características reprodutivas em fêmeas bovinas leiteiras. **Ciência Veterinária**, Jaboticabal, v.4, n.1, p. 07-08, 1990.

GOODMAN, L.A. Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial populations. **Ann. Math. Stat.**, San Francisco, v.35, n.2, p.716-725, 1964.

GOODMAN, L.A. On simultaneous confidence intervals for multinomial proportions. **Tedinometrics**, Milwaukee, v.7, n.2, p.247-254, 1965.

GUIMARÃES, M.C.; CÔRTEZ, J.A.; VASCONCELLOS, S.A.; ITO, F.H. Epidemiologia e controle de leptospirose em bovinos. Papel do portador e seu controle terapêutico. **Comun. Cient. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. São Paulo**, São Paulo, v. 6/7, p. 21-34, 1982/83.

HARKIN, K.R., GARTRELL, C.L. Canine leptospirosis in New Jersey and Michigan: 17 cases (1990-1995). **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, Denver, v. 32, p. 495-501, 1996.

IBGE - FUNDAÇÃO DO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censos demográficos**. Rio de Janeiro, 2000. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 20. mar. 2001.

JOUGLARD, S.D.D.; BROD, C.S. Leptospirose em cães: prevalência e fatores de risco no meio rural do município de Pelotas, RS. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 67, n. 2, p. 181-5, jul./dez. 2000.

KEE, S.H.; KIM, I.S.; CHOI, M.S.; CHANG, W.H. Detection of leptospiral DNA by PCR. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 32, p. 1035-1039, 1994.

LEPTOSPIROSIS cases rising in United states. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v. 12, p. 472, 1998.

LILENBAUM, W.; RODRIGUES, F.; BARBOZA, F. Aglutininas antileptospiras em caninos do município amazônico de Oriximiná-Pará, Brasil. **Rev. bras. Cienc. Vet.**, Niterói, v.3, p. 133-135, set./dez. 2000.

MAILLOUX, M. Leptospiroses = Zoonoses. **Int. J. Zoonoses**, Taipei Taiwan, v. 2, p. 45-54, 1975.

MASCOLLI, R.; PINHEIRO, S.R.; VASCONCELLOS, S.A ; FERREIRA, F.; MORAIS, Z.M.; PINTO, C.O.; SUCUPIRA, M.C.A.; DIAS, R.A.; MIRAGLIA, F.; CORTEZ, A.; SILVEIRA DA COSTA, S.; TABATA, R.; MARCONDES, A.G. Inquérito sorológico para leptospirose em cães do município de Santana de Parnaíba, São Paulo, utilizando a campanha de vacinação anti-rábica do ano de 1999. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.69, n.2, p.5-32, abr./jun., 2002.

MORALES, A.; GÍRIO, R.J.S.; MATHIAS, A. Casos de leptospirose em cães atendidos no Hospital Veterinário da FCAVJ-UNESP durante o período de 1986 a 1990. **Ciência Veterinária**, Jaboticabal, v.4, n.2, p.05-06, 1990.

MYBURGH, J.G.; POSNETT, S.J.; LAWRENCE, J.V. Serological survey for canine leptospirosis in the Petroria area. **J. S. Afr. Vet. Assoc.**, Pretória v. 64, p. 37-38, 1993.

MYERS, D.M. Leptospiral antibodies in stray dogs of Moreno, Province of Buenos Aires, Argentina. **Rev. Argent. Microbiol.**, Buenos Aires, v.12, p.18-22, 1980.

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

PINEDA, M., LÓPEZ, J., GARCIA, M. Frecuencia de leptospirosis en perros al test de aglutinación microscópica en Chillán - Chile. **Arch. Med. Vet.**, Vildivia, v. 28, p. 59-65, 1996.

PREGNOLLATO, P.B.; RODRIGUES, P.; ARREAZA, A.L.V.; SOARES, M.C.B.; ZAMARIOLLI, L.A.; ROMERO, E.C. Estudo soroepidemiológico

da leptospirose na Baixada Santista, São Paulo, Brasil. **Leptospirose**. Disponível em: <<http://www.newslab.com.br>>. Acesso em: 12 de dez. 2000.

PRESCOTT, J.F.; FERRIER, R.L.; NICHOLSON, V.M.; JOHNSTON, K.M.; HOFF, B. Is canine leptospirosis underdiagnosed in southern Ontario? A case report and serological survey. **Can. Vet. J.**, Ottawa, v. 32, p. 481-486, 1991.

QUINN, P.J.; CARTR, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. **Clinical Veterinary Microbiology**. London: Wolfe, 1994. 648p.

RATNAM, S.; EVERARD, C.O.R.; ALEX, C. A pilot study on the prevalence of leptospirosis in Tamilnades state. **Indian Vet. J.**, Madras, v.71, p. 1059-1063, 1994.

RYU, E. An international survey of leptospiral agglutinin of dogs by RMAT. **Int. J. Zoonoses.**, Taipei Taiwan, v. 3, p. 33-60, 1976.

SAKATA, E.E.; YASUDA, P.H.; ROMERO, E.C; SILVA,M.V.; LOMAR, A.V.Sorovares de *Leptospira interrogans* isolados de casos de leptospirose humana em São Paulo, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v.4, n.3, 1992.

SANTA ROSA, C.A. Diagnóstico laboratorial das leptospiroses. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v.1, n.2, p. 97-109, out./dez., 1970.

SANTA ROSA, C.A.; BATISTA JÚNIOR, J.A.; TERUYA, J.M.; YANAGITA, R.M. Inquérito sorológico para leptospirose e brucelose em cães da

cidade de Belo Horizonte. **Arq. Esc. Vet. UFMG.**, Belo Horizonte, v.26, n.3, p.339-342, 1974.

SANTA ROSA, C.A., HYAKUTAKE, S., BIASI, P., BELLUOMINI, H.E., KAWARABAYASHI, M., GODANO, A. Contribuição ao estudo epidemiológico das leptospiroses em serpentes do Brasil. II . Levantamento sorológico em *Crotalus durissus terrificus* Laurenti, 1768 (*Viperidae: Crotalinae*) – Cascavel. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 40, p. 9-13, 1980.

SANTA ROSA, C.A.; PESTANA de CASTRO, A.F.; SILVA, A.S.; TERUYA, J.M.; Nove anos no Instituto Biológico e São Paulo. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 29/30, p.19-27, 1969/70.

SÃO PAULO. (Estado). Secretaria do estado de saúde - **Manual de vigilância epidemiológica: Leptospirose: normas e instruções**. São Paulo, 1983.

SCANZIANI, E.; CALCATERRA, S.; TAGLIABUE, S.; LUINI, M.; GIUSTI, A.M.; TOMBA, M. Serological findings in cases of acute leptospirosis in the dog. **J. Small Anim. Pract.**, Oxford, v.35, p. 257-60, 1994.

STEGER-LIEB, A.; GERBER, B.; NICOLET, J.; GASCHEN, F. An old disease with a new face: canine leptospirosis does not lose its relevance. **Schweiz Arch Tierheilk.**, Zurich, v.141, p. 499-507, 1999.

STREINER, D.L.; NORMAN, G.R. **Biostatistics: the base essentials**. St. Louis: Mosby – Year Book, 1994. 260 p.

SZYFRES, B. Leptospirosis as animal and public health problem in Latin America and the Caribbean area. **Pan Amer. Health Org. Bull.**, Washington, v.10, p. 110-25, 1976.

THIRUNAVUKKARASU, P.S.; SRINIVASAN, S.R.; RATNAM, S.; GNANAPRAKASAM, V. Ocular manifestations in canine leptospirosis. **Indian Vet. J.**, Madras, v.72, p. 200-201, 1995.

VAN DEN BROEK, A.H.M.; THURSFIELD, M.V.; DOBBIE, G.R.; ELLIS, W.A. A serological and bacteriological survey of leptospiral infection in dogs in Edinburgh and Glasgow. **J. Small Anim. Pract.**, Oxford, v.32, p.118-24, 1991.

VASCONCELOS, L.M.; CISALPINO, E.O.; VIEIRA, M.N.R.; KOURY, M.C. Pesquisa de aglutininas antileptospiras em diferentes grupos profissionais na cidade de Londrina, Paraná. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Rio de Janeiro, v.25, n.4, p.251-55, out/dez., 1992.

VENKATARAMAN, K.S.; NEDUNCHELLIAN, S. Epidemiology of an outbreak of leptospirosis in man and dog. **Comp. Immunol., Microbiol. Infect. Dis.**, Exeter, v. 15, p. 243-247, 1992.

VENKATARAMAN, K.S.; NEDUNCHELLIAN, S.; RAMADASS, P.; RAMKRISHNA, J. Haemato – biochemical changes in experimental leptospirosis in dogs. **Indian Vet. J.**, Madras, v. 69, p. 145-146, 1992.

VERONESI, R.; CORRÊA, M. O. A.; EDELWEISS, E.L. Leptospiroses. In: **Doenças infecciosas e parasitárias**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1972. p. 287-801.

VERONESI, R.; NETO, V. A.; CORRÊA, M.O.A. Leptospirose em cães da cidade de São Paulo. Inquérito sorológico. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v.16, p. 78-84, 1956.

VIEGAS, S.A.R.A.; TAVARES, C.H.T.; OLIVEIRA, E.M. de D.; DIAS, A.R., MENDONÇA, F.F.; SANTOS, M. de F.P. Investigação sorológica para leptospirose em cães errantes na cidade de Salvador-Bahia. **Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.**, v.2, p.21-30, 2001.

WEEKES, C. C., EVERARD, C.O. R., LEVETT, P. N. Seroepidemiology of canine leptospirosis on the island of Barbados. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v.51, p. 215-222, 1997.

YASUDA, P. H.; SANTA ROSA, C.A.; MYERS, D. M.; YANAGUITA, R.M. The isolation of leptospires from stray dogs in the city of São Paulo, Brazil. **Int. J. Zoonoses.**, Taipei Taiwan, v. 7, p. 131-134, 1980a.

YASUDA, P.H.; SANTA ROSA, C.A.; YANAGUITA, R.M. Variação sazonal na prevalência da leptospirose em cães de rua da cidade de São Paulo. **Rev. Saúde Pública.**, v.11, p.589-596, 1980b.

ZUERNE, R.L., ALT, D., BOLIN, C.A. IS1533 - Based PCR assay for identification of *Leptospira interrogans* sensu lato serovars. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 33, n.12, p. 3284-3289, 1995.

ZUERNE, R.L.; BOLIN, C.A. Differentiation of *Leptospira interrogans* isolates by IS1500 hybridization and PCR assays. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.35, n.10, p.2612-2617, 1997.

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO 1 - Meio de Fletcher – Semi- sólido (para 500ml)

- 1) Adicionar 1,25g de meio Fletcher em 460ml de água de Mili-Q;
- 2) Autoclavar a 121°C por 15 minutos;
- 3) Deixar esfriar até 56°C;
- 4) Adicionar 40ml de soro de coelho previamente filtrado e inativado a 56°C por 30 minutos;
- 5) Acrescentar 0,01g de ácido nalidíxico;
- 6) Deixar aproximadamente 100 tubos de rosca pequenos estéreis e o meio na capela, sob ação de luz ultravioleta por 1 hora;
- 7) Passar 5ml do meio para cada tubo de rosca;
- 8) Passar uma alíquota do meio para BHI antes e depois de passá-lo o meio para os 100 tubos, e deixar os tubos em estufa a 37°C por 24 a 48 horas (controle de esterilidade).

ANEXO 2 - Meio de Ellinghausen (EMJH) - (Albumina bovina “Tween 80”):

Preparar as seguintes soluções-estoque em água Mili-Q:

- 1) Cloreto de Amônio (NH_4Cl) 25%: **2,5g em 10ml**
- 2) Sulfato de Zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0,4%: **0,4g em 100ml**
- 3) Cloreto de Magnésio ($\text{MgCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e Cloreto de Cálcio ($\text{CaCl} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) 1,5% **1,5g de cada em 100ml**
- 4) Sulfato Ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0,5%: **0,5g em 100ml** - preparar na hora de acrescentar o suplemento de albumina
- 5) Piruvato de Sódio 10%: **1g em 10ml**

6) Glicerina 10%: **1ml de glicerina em 9ml de água**

Mili-Q

7) Tween 80 10%: **5ml em 45ml de água Mili-Q**

8) Tiamina (Vit. B1) 0,5%: **50µl de Monovin B1® em 1000ml de meio**

9) Cianocobalamina (Vit. B12) 0,02%: **0,2 ml de Monovin B12® em 1000 ml de meio**

As soluções-estoque devem ser armazenadas no refrigerador.

- Meio Base:

Em Erlenmeyer, aferido de 1000 ml, colocar:

1) Fosfato dissódico (Na_2HPO_4): **1g**

2) Fosfato monopotássico (KH_2PO_4): **0,3g**

3) Cloreto de sódio (NaCl): **1g**

Dissolver essas substâncias em cerca de 900ml de água Mili-Q e acrescentar os seguintes volumes das soluções:

1) Cloreto de amônio a 25%: **1ml**

2) Tiamina: **50µl (0,05 ml)**

3) Piruvato de sódio a 10%: **1ml**

4) Glicerina a 10%: **1ml**

Ajustar o pH em 7,4 com hidróxido de sódio N/10 e completar o volume a 1000 ml com água Mili-Q.

Desprezar 100ml. Esterilizar os 900 ml restantes em autoclave a 121°C por 15 minutos.

- Suplemento de albumina:

Dissolver 10g de albumina bovina (fração V) em 50 ml de água Mili-Q e acrescentar as soluções-estoque nos seguintes volumes:

1) Cloreto de Cálcio/ Cloreto de Magnésio a 1,5%: **1,0ml**

2) Sulfato de Zinco a 0,4%: **1,0ml**

3) Sulfato Ferroso a 0,5%: **10,0ml**

4) Cianocobalamina: **0,2ml (PURO)**

5) "Tween 80" a 10%: **12,5ml**

Ajustar o pH em 7,4 e completar o volume a 100ml com água Mili-Q.

Esterelizar por filtração.

Meio Líquido Completo (EMJH):

- Meio Base estéril: **900ml**

- Suplemento de Albumina estéril: **100ml**

Distribuir em tubos de rosca em volume de 5 a 10ml.

Realizar prova de esterilidade e viabilidade, utilizando o caldo BHI (Brain Heart Infuse) antes e após a passagem do meio para os tubos.

Armazenar em refrigerador.