

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 13/09/2018.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE HIGIENE VETERINÁRIA E SAÚDE PÚBLICA

**INFECÇÃO LEPTOSPÍRICA EM CÃES: ESTUDO
SOROLÓGICO, BIOQUÍMICO E MOLECULAR, E
AVALIAÇÃO DE FATORES DE RISCO**

VÍVIAN FERREIRA ZADRA

BOTUCATU/SP

MARÇO 2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNICA
DEPARTAMENTO DE HIGIENE VETERINÁRIA E SAÚDE PÚBLICA

**INFECÇÃO LEPTOSPÍRICA EM CÃES: ESTUDO
SOROLÓGICO, BIOQUÍMICO, MOLECULAR, E
AVALIZAÇÃO DE FATORES DE RISCO**

VÍVIAN FERREIRA ZADRA

Tese apresentada junto ao Programa
de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Paes

BOTUCATU/SP

MARÇO 2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Zadra, Vívian Ferreira.

Infecção leptospírica em cães : estudo sorológico,
bioquímico, molecular, e avaliação de fatores de risco /
Vívian Ferreira Zadra. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio
de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia

Orientador: Antonio Carlos Paes

Capes: 50502034

1. Cães - Doenças. 2. Leptospirose em animais. 3. Fatores
de risco. 4. Diagnóstico. 5. Epidemiologia.

Palavras-chave: Cães; Diagnóstico; Epidemiologia; Fatores de
risco; Leptospirose.

Nome do Autor: Vívian Ferreira Zadra

Título: INFECÇÃO LEPTOSPÍRICA EM CÃES: ESTUDO SOROLÓGICO, BIOQUÍMICO E MOLECULAR, E AVALIZAÇÃO DE FATORES DE RISCO

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Adj. Antonio Carlos Paes

Presidente e Orientador

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP – Botucatu - SP

Prof. Titular Hélio Langoni

Membro

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP – Botucatu - SP

Profa. Dra. Simone Baldini Lucheis

Membro

Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios

APTA – Centro-Oeste – Bauru - SP

Prof. Associado Marcelo de Souza Zanutto

Membro

Departamento de Clínica Veterinária - Centro de Ciências Agrárias

Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina – PR

Profa. Adj. Francielle Gibson da Silva Zacarias

Membro

Departamento de Veterinária e Produção Animal

Universidade Estadual do Norte do Paraná – UENP, Bandeirantes – PR

Data da Defesa: 13 de março de 2017.

DEDICATÓRIA

À TODOS OS ANIMAIS.

"Nós seres humanos, estamos na natureza para auxiliar
o progresso dos animais, na mesma proporção que
os anjos estão para nos auxiliar.
Portanto quem chuta ou maltrata um
animal é alguém que não aprendeu a amar".
(Chico Xavier)

DEDICATÓRIA (*in memorian*)

Dias antes da finalização desta tese, meu companheiro mais velho veio a falecer
durante a correção deste trabalho...

Obrigada por todo amor incondicional ao longo desses 15 anos, por me ensinar o
verdadeiro significado da vida. Estamos aqui apenas de passagem para evoluir,
obrigada por fazer parte da minha vida e permitir que eu pudesse cuidar de você
todos esses anos e principalmente nas últimas horas de sua vida.

Dedico à você Nino!

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, **Fátima**, por sempre me apoiar, incentivando e guiando para que eu jamais desistisse, principalmente nesses últimos anos por toda dificuldade em que passamos. Por todo amor incondicional, muito obrigada! Te amo!

À **Tia Lia**, tia, amiga e mãe número 2, pelo companheirismo, conselhos e afinidade desde o meu nascimento. Por todas as horas de descontração e pela ajuda nas horas tensas também, muito obrigada!

À **Dr^a. Claudia de Camargo Tozato**, colega de trabalho por destino e amiga por opção. Muito obrigada por compartilhar dos momentos alegres, tristes, difíceis e divertidos. Você é a melhor companheira de trabalho, de vida e amiga que eu poderia ter. Obrigada por tudo!

Agradeço imensamente ao meu orientador, **Prof. Dr. Antonio Carlos Paes**, por ter acreditado em mim e ter me acolhido desde a época da graduação. Reconheço e sou extremamente grata por toda a sua ajuda, paciência e compreensão durante a minha trajetória dentro da UNESP - Botucatu.

Ao **Prof. Dr. Hélio Langoni**, por disponibilizar o Laboratório de Diagnóstico de Zoonoses da FMVZ – UNESP, Botucatu para que esse trabalho fosse realizado. E principalmente, pela compreensão e disponibilidade para esclarecer minhas dúvidas.

Agradeço aos integrantes da equipe do Laboratório de Diagnóstico de Zoonoses da FMVZ – UNESP, Botucatu. Gostaria de agradecer especialmente as residentes **Dália Monique Ribeiro Machado** e **Mariana Aimee Ramos Xavier da Silva** por estarem sempre dispostas a me socorrer durante os procedimentos realizados no laboratório.

Agradeço à **Prof^a. Dr^a. Simone Baldini Lucheis** por ter aceitado participar da minha banca examinadora de qualificação e defesa de tese. Tenho certeza que as contribuições serão extremamente valiosas.

Ao **Prof. Dr. Marcelo de Souza Zanutto**, por aceitar o convite e participar mais uma vez da minha banca. Por te me inspirado desde a graduação, a desvendar o misterioso mundo das doenças infecciosas dos felinos (sim, ainda

meu coração bate mais forte pelos vírus que acometem os felinos). Sempre estive disposto a esclarecer dúvidas.

À **Prof^a Dr^a Francielle Gibson da Silva Zacarias**, professora, ex-orientadora e amiga. Agradeço por ter acreditado em mim ao longo desses anos, pelas críticas e sugestões relevantes, pelo apoio e amizade construída desde o tempo de graduação.

À todos os professores e funcionários da FMVZ que contribuíram, com conhecimentos e conselhos, para minha formação profissional. Principalmente à **Adriana Pavan**, que me ensina a casa dia que um bom sorriso muda o cotidiano de todos. **Wanderley** sempre pronto a ajudar, enfim a todos que tive o prazer de conhecer no DHVSP.

À **Secretaria de Saúde da prefeitura de Botucatu, Setor de Educação e Comunicação em Saúde (SEDUCS)**, pela colaboração com o projeto, autorizando a colheita das amostras no Canil Municipal. Em especial aos veterinários **Emerson Legatti** e **Selene Balboni** que foram sempre muito prestativos.

Ao **Robson Marques Joaquim** e à **ONG – Organização Mãos e Patas de Botucatu**, por colaborarem imensamente com as coletas, e principalmente pela confiança e amizade construída.

Aos **Aluno de Graduação em Medicina Veterinária da FMVZ – UNESP, Botucatu (1º, 2º e 3º ano de 2016)**, sou imensamente grata à todos vocês que me ajudaram nas coletas, na campanha de vacinação, na campanha de castração, indo de casa em casa, embaixo de sol e chuva! Obrigada pelos momentos de descontração, alguns momentos tensos, porém me fizeram acreditar que estou no caminho certo.

Ao **Rodolfo Rossi**, mestrando do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da FMVZ – UNESP, Botucatu, por todo auxílio com a parte estatística.

À **Mônica Midon** e **Paula Nunes Coelho**, por compartilharem do mesmo lar em Botucatu, dividindo os mesmos problemas, pelas conversas e desabafos até tarde da noite e algumas “gordices”.

À **Clarisse Guillem Cardoso** e **Thais Lisboa Machado Romano**, amigas de graduação, onde nem o tempo e a distância permitiu que nossa amizade se acabasse. Amizade como a de vocês é pra vida toda!

À **Aisla do Nascimento Lima** e **Bárbara Ayres Zanda**, amizade desde os tempos de colégio, sobrevivendo à distância, atravessando oceanos, há mais de 15 anos! Obrigada pela amizade e parceria sempre!

À **Ariani Cristina da Silva Almeida**, por toda ajuda e longas conversas durante a etapa de pós-graduação, dividindo aflições e aprendizado.

Aos colegas do **Centro Veterinário de Bauru**, pelos longos plantões realizados ao longo dos últimos anos, por compartilharem de momentos bons e ruins no dia-a-dia da clínica. Em especial, à **Renata dos Santos Ramos**, colega de trabalho que acabou se tornando amiga, compartilhando de momentos únicos. Um pouco mãe, um pouco irmã, um pouco amiga, um pouco psicóloga, enfim, uma amizade verdadeira. Obrigada por tudo!

À **todos os proprietários dos animais** que participaram do estudo, pela confiança, compreensão e disponibilidade das coletas. Aprendi muito com vocês!

Aos meus filhos de quatro patas: **Nino, Getúlio, Maurício e Pietro**, que sempre com algum gesto de carinho me apoiavam quando eu mais precisava. Ao **Leonardo, Luiz Henrique, Tico (in memorian)** que passaram por minha vida trazendo um pouco mais de alegria. Em especial, **Fofão (in memorian)**, vulgo Gordinho da Ví, que foi muito mais do que um gato em minha vida, me trouxe muito aprendizado, me ensinando o verdadeiro significado da palavra Amor.

À **CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior)** pela concessão da bolsa.

Enfim,

À todos os animais, que permitiram do estudo um grande aprendizado!

“... Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena
Acreditar num sonho que se tem
Ou que seus planos nunca vão dar certo
Ou que você nunca vai ser alguém...
Se você quiser alguém em quem confiar
Confie em si mesmo
Quem acredita sempre alcança.”
(Mais Uma Vez: Legião Urbana)

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 Bateria de sorovares de <i>Leptospira spp.</i> mantidos na rotina diagnóstica do Laboratório de Diagnóstico de Zoonoses da FMVZ- UNESP/ Botucatu – SP.....	50
--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Frequência de sorovares e os respectivos títulos em amostras de cães na SAM, provenientes do serviço de atendimento do HV da FMVZ – UNESP, Botucatu/SP, Canil Municipal e cães domiciliados no município de Botucatu-SP.....	55
TABELA 2 Frequência dos fatores de risco para leptospirose de cães provenientes do serviço de atendimento do HV da FMVZ – UNESP, Botucatu/SP, Canil Municipal e cães domiciliados no município de Botucatu-SP tais como: idade, sexo, vacinação, zona, presença de roedores, saneamento básico, acesso à rua, presença de contactantes, enchente, alimento à vontade e zona urbana, associados aos resultados de sorologia, considerando 318 como 100%.....	58
TABELA 3 Significância estatística (p-valor) entre as variáveis do estudo correlacionadas com a soropositividade para leptospirose em 318 cães atendidos no HV da FMVZ – UNESP, Botucatu –SP, Canil Municipal e domiciliados na cidade de Botucatu – SP.....	59
TABELA 4 Significância estatística da diferença entre diversas categorias da variável zona urbana, estimativa para razão das chances e seus respectivos intervalos de confiança de 95% na avaliação da procedência de cães atendidos no HV da FMVZ – UNESP, Botucatu –SP, Canil Municipal e domiciliados na cidade de Botucatu – SP.....	60
TABELA 5 Frequência das alterações dos exames bioquímicos dos cães reagentes à SAM, atendidos no HV da FMVZ – UNESP, Botucatu –SP, Canil Municipal e domiciliados na cidade de Botucatu – SP.....	63

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Mapa representativo do município de Botucatu/SP, com a indicação dos bairros abrangidos no estudo e respectiva distribuição das amostras analisadas em cada bairro..... 61

FIGURA 2 Gel de agarose a 2%, com presença de banca única fluorescente do controle positivo. Todas as amostras de urinas testadas apresentaram-se negativas. M = marcador de peso molecular 100 pb..... 62

LISTA DE ABREVIATURAS

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

DNTP's - Dextrorribonucleotídeos trifosfato

EDTA - Ácido Etilenodiamino tetra-acético

g - aceleração de gravidade (9,8m/s²)

IgG - Imunoglobulina G

IgM - Imunoglobulina M

MgCl₂ - Cloreto de magnésio

mL - mililitro

mm - milímetro

mM - milimolar

M - molar

OR - Odds ratio

PCR - reação em cadeia da polimerase

SAM - soroaglutinação microscópica

pb - pares de bases

pH - potencial hidrogeniônico

SST - Solução Salina Tamponada

Taq-polimerase - polimerase termoestável

TBE - Tris Borato EDTA

pm - peso molar

UI - unidade internacional

μL - microlitro

% - porcentagem

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	17
RESUMO	18
ABSTRACT	19
1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 Histórico	22
2.2. Agente etiológico	22
2.3. Taxonomia	24
2.4. Epidemiologia	26
2.5. Patogenia	29
2.6. Clínica	33
2.7. Diagnóstico	35
2.7.1. Aspectos laboratoriais	35
2.7.2.Soroaglutinação Microscópica (SAM)	36
2.7.3. Identificação do micro-organismo	38
2.8. Terapêutica	39
2.9. Imunização	41
2.10. Reflexos em Saúde Pública	42
2.11. Prevenção	44
3. OBJETIVOS	46
3.1. Geral	46
3.2. Específicos	46
4. MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1. Cálculo do tamanho amostral	47
4.2. Animais	47

4.3. Coleta de material biológico	47
4.4. Exames diagnósticos	48
4.4.1. Soroaglutinação microscópica	48
4.4.2. Análise bioquímica	51
4.4.3. Diagnóstico molecular	51
4.4.3.1. Preparação de amostra e extração DNA	51
4.4.3.2. Extração de DNA	51
4.4.3.3. PCR e eletroforese	52
4.5. Questionário epidemiológico	53
4.6. Análise estatística	54
5. RESULTADOS	54
6. DISCUSSÃO	64
6.1 LIMITAÇÕES	68
7. CONCLUSÕES	69
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
ANEXO 1	77
ANEXO 2	79
ANEXO 3	80
ANEXO 4	81
ANEXO 5	82
CAPÍTULO II	87
10. ARTIGO CIENTÍFICO	89
10.1. Normas para publicação.....	89
10.2. Artigo	90

CAPÍTULO I

ZADRA, V.F. **Infecção Leptospírica em Cães: Estudo Sorológico, Bioquímico e Molecular, e Avaliação de Fatores de Risco**. Botucatu, 2017. 86 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

A leptospirose figura entre as principais zoonoses em todo o mundo. Os animais domésticos e silvestres são elos fundamentais na cadeia de transmissão do patógeno para os seres humanos. Dentre os animais domésticos, o cão é reconhecido como importante fonte de infecção em áreas urbanas, representando sério problema de saúde pública. Mesmo imunizados, os cães podem eliminar leptospiras na urina durante longos períodos. O contato com água ou solo contaminado pela urina destes animais constitui importante via de transmissão o humano. O objetivo desse trabalho foi avaliar 318 cães portadores assintomáticos para o gênero *Leptospira* spp. em amostras obtidas do HV da FMVZ, do canil municipal e de cães domiciliados no município de Botucatu – SP pelas técnicas de soroaglutinação microscópica (SAM), reação em cadeia da polímerase (PCR) para *Leptospira* spp, e avaliação bioquímica. Aplicou-se também um questionário epidemiológico para avaliação dos fatores de risco da doença no município. Os sorovares mais prevalentes foram NUP 50%, Gryppotyphosa 42%, Copenhageni 52%, Icterohaemorrhagiae 42%, observando-se uma prevalência de 42,77% de sororeagentes. Não foram encontradas amostras positivas pela técnica de PCR. O fator de risco estatisticamente significativo foi a variável zona urbana, sendo mais prevalente os animais sororreagentes provenientes dos bairros da zona sul e oeste do município de Botucatu - SP. Conclui-se que a bactéria leptospira está circulante nos cães assintomáticos avaliados, podendo-se dispersar a bactéria para outros animais e inclusive para os humanos.

Palavras – chave: leptospirose, cães, epidemiologia, fatores de risco, diagnóstico de portadores.

ZADRA, V.F. **Leptospira Infection in Dogs: a Serological, Biochemical and Molecular study, and Evaluation of Risk Factors**. Botucatu, 2017. 86 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista

ABSTRACT

Leptospirosis is among the leading zoonoses worldwide. Domestic and wild animals are key links in the transmission chain of the pathogen to humans. Among domestic animals, the dog is recognized as an important source of infection in urban areas, representing a serious public health problem. Even immunized, dogs can eliminate leptospires in the urine for long periods. Contact with water or soil contaminated by urine of these animals constitutes an important human transmission route. The objective of this study was to evaluate 318 dogs asymptomatic carriers for the genus *Leptospira* spp. In samples obtained from the veterinary hospital of UNESP, the municipal kennel and dogs domiciled in the municipality of Botucatu - SP by the microscopic serum agglutination (SAM) techniques, polymerase chain reaction (PCR) for *Leptospira* spp, and biochemical evaluation. An epidemiological questionnaire was also applied to evaluate the risk factors of the disease in the municipality. The most prevalent serovars were NUP 50%, Gryppotyphosa 42%, Copenhageni 52%, Icterohaemorrhagiae 42%, with a prevalence of 42.77% of seroreagents. No positive samples were found by the PCR technique. The statistically significant risk factor was the urban zone variable, the most prevalent being the seroreagent animals from the southern and western districts of the city of Botucatu - SP. It is concluded that leptospira bacteria are circulating in the asymptomatic dogs evaluated, being able to disperse the bacteria to other animals and even humans.

Key – words: leptospirosis, dogs, epidemiology, risk factors, carrier diagnosis.

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de importância mundial. É uma doença infectocontagiosa causada por bactérias do gênero *Leptospira*, que são espiroquetas aeróbicas, que se deslocam por movimentos “saca-rolha”, caracterizados por flexão, extensão e rotação em seu próprio eixo (DAHER; ABREU; SILVA JUNIOR, 2010; GOLDSTEIN, 2010).

Rattus norvegicus (ratazana) é o mais importante reservatório de *Leptospira* spp., principalmente em regiões urbanas, sendo os principais hospedeiros de manutenção da *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni e Icterohaemorrhagiae, ambos pertencentes ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae, responsáveis por causar icterícia grave em animais e seres humanos (VIEGAS et al., 2001; DAHER; ABREU; SILVA JUNIOR, 2010).

Segundo Blazius et al. (2005), no período entre 1980 e 2003, a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, confirmou 53.354 casos de leptospirose humana no Brasil. Entre 1994 a 2003, foram registrados 3.324 casos por ano, com taxa média de letalidade anual de aproximadamente 10%.

Leptospira spp. invade o hospedeiro pela mucosa oral, nasal, e/ou ocular, assim como através da pele lesada. Estas bactérias multiplicam-se rapidamente nas células endoteliais vasculares, migrando para tecidos como fígado, rins, baço, sistema nervoso central (SNC), olhos, pulmões e trato genital. O período de incubação é de aproximadamente sete dias nos cães, podendo ocorrer variações (GREENE et al., 2012).

Os cães possuem importante papel na disseminação da doença, atuando como fonte de infecção para os humanos devido à relação de proximidade entre estas espécies. Mesmo após o tratamento, muitos cães podem permanecer portadores renais inaparentes da *Leptospira* spp. por tempo indeterminado, podendo, assim, eliminar esta bactéria pela urina no ambiente, durante semanas, meses ou anos, colocando em risco outros animais e humanos. Desta forma, os cães seguem como disseminadores das leptospirosas representando grande risco para a saúde pública (MODOLO et al., 2006; MAGALHÃES et al., 2007; AZÓCAR-AEDO, SMITS, MONTI, 2014).

O estudo epidemiológico da leptospirose é dificultado pela diversidade dos sorovares, variações regionais, assim como pelo grande espectro de

espécies domésticas acometidas. Já se constatou, porém, a existência da predileção de sorovares por determinadas espécies, podendo um único hospedeiro ser infectado por mais de um sorovar concomitantemente (GOLDSTEIN, 2010).

Devido à grande dificuldade de cultivo e isolamento das leptospiros, a sorologia torna-se o método de diagnóstico mais utilizado nos inquéritos epidemiológicos de leptospirose (SILVA et al., 2009; MORIKAWA, et al., 2015).

A Soroaglutinação Microscópica (SAM) com antígenos vivos é o teste de referência para o diagnóstico da leptospirose animal e humana (BRASIL, 1995; WHO, 2003). A identificação de cães portadores assintomáticos é objeto de grande preocupação do ponto de vista de saúde pública, bem como para o profissional que exerce a clínica (KOIZUMI, et al., 2013).

O presente estudo objetivou avaliar a prevalência de cães portadores assintomáticos de leptospiros, visando avaliar as áreas de risco e procedência dos animais, no município de Botucatu – SP, pelo exame sorológico pela técnica de SAM, PCR de urina, perfil bioquímico e aplicação de um questionário epidemiológico aos proprietários dos animais para identificar os fatores de risco (Anexo 1).

7. CONCLUSÕES

O presente trabalho permitiu detectar a presença de cães sorologicamente positivos para o gênero *Leptospira* spp. pela técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM), porém não podemos afirmar que eles estavam eliminando a bactéria pela urina no exato momento da coleta, pois os resultados das PCRs foram negativos. Isto nos leva a supor que a eliminação na urina é intermitente, devendo ser realizadas novas coletas, em dias consecutivos para monitorar o paciente, ou até duas vezes ao dia em dias consecutivos.

Os dados obtidos no estudo permitiram inferir quais são os sorovares mais frequentes detectados pela técnica de SAM em cães domiciliados e assintomáticos da cidade de Botucatu/SP, verificando-se animais com títulos altos de anticorpos para diversos sorovares. Sendo que vários animais apresentaram títulos para até cinco sorovares diferentes, ressaltando a importância da colonização renal. A diferença estatística encontrada nos diferentes bairros analisados, permite supor as prováveis áreas de risco na cidade.

O presente trabalho mostrou que a sorologia é mais confiável que a PCR, a não ser que mais de uma amostra de urina seja coletada em um dia ou por mais período de tempo.

Neste trabalho, os animais assintomáticos, porém sororreagentes para leptospirose, podem constituir uma importante fonte de infecção para outros cães e animais de diferentes espécies, e principalmente para o homem.

8. REFERÊNCIAS*

ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. Vet. Microbiol. 140, 287 – 296. 2010.

ADIN, C. A.; COWGILL, L. D. Treatment and outcome of dogs with leptospirosis: 36 cases (1990-1998). J. Am. Vet. Med. Assoc., v. 216, n. 3, p. 371-375, 2000.

ANDRADE, L.; RODRIGUES JR., A. C.; SANCHES, T. R. C.; SOUZA, R. B.; SEGURO, A. C. Leptospirosis leads to dysregulation of sodium transporters in the kidney and lung. Am. J. Physiol. Renal Physiol., v. 292, p. F586-F592, 2007.

AZÓCAR-AEDO, L.; SMITS, H.L.; MONTI, G. Leptospirosis in dogs and cats: epidemiology, clinical disease, zoonotic implications and prevention. Arch. Med. Vet., v.46, p.337 – 348, 2014.

BARBANTE, P.; SHIMABUKURO, F.H.; LANGONI, H.; RICHINI-PEREIRA, V.B. LUCHEIS, S.B. *Leptospira* spp. infection in sheep herds in southeast Brazil. J.of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, v.20, 2014.

BAL, A.E.; GRAVEKAMP, C.; HARTSKEERK, R.A.; DE MEZA-BREWSTER, J.; KORVER, H.; TERPSTRA, W.J. Detection of Leptospire in Urine by PCR for Early Diagnosis of Leptospirosis. J.of Cl.Micro., p. 1894 – 1898, 1994.

BATISTA, C.; AZEVEDO, S.; ALVES, C.; VASCONCELOS, S.; MORAIS, Z.; CLEMENTINO, I.; LIMA, S.; NETO, J. Seroprevalence of leptospirosis in stray dogs from Patos City, State of Paraíba, Brazil. Braz. J Vet Res Anim Sci 41, 131 – 136, 2004.

BHARTI, A. R., NALLY, J. E. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. The Lancet Infectious Diseases, v. 3, p. 757-770, 2003.

BLAZIUS, R. D.; ROMÃO, P. R. T.; BLAZIUS, E. M. C. G.; SILVA, O. S. Ocorrência de cães errantes soropositivos para *Leptospira* spp. na cidade de Itapema, Santa Catarina, Brasil. Cad. Saúde Pública, v. 21, n. 6, p. 1952-1956, 2005.

BRASIL. Manual de Leptospirose. 2ª edição. Fundação Nacional de Saúde. Ministério da Saúde. Brasília, p. 98, 1995.

BROWN, C. A.; ROBERTS, A. W.; MILLER, M. A.; DAVIS, D. A.; BROWN, S. A.; BOLIN, C. A.; JARECKI-BLACK, J.; GREENE, C. E.; MILLER-LIEBL, D. *Leptospira interrogans* sorovar Grippotyphosa infection in dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc., n. 7, p. 1265-1267, 1996.

*ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação - Referências - Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

CASTRO, J. R., SALABERRY, S. R., SOUZA, M. A., & LIMA-RIBEIRO, A. M. Predominant *Leptospira* spp. serovars in serological diagnosis of canines and humans in the City of Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 44, n. 2, p. 217-222, 2011.

CDC. Epi Info 3.5.1. Disponível em: www.cdc.gov/epiinfo 2008. (Acessado em Janeiro de 2015).

CERQUEIRA, G.; PICARDEAU, M. A century of *Leptospira* strain typing. *Infect. Genet. Evol.* 9, 760 – 768. 2009.

CIUFFA, A.Z.; SANTOS, L.S.; FUJIMOTO, T.A.S.; GOMES, D.O.; REZENDE, L.M.; PIRES, B.C.; SILVA, D.M.; LIMA, A.M.C. Anticorpos antileptospira spp. em cães destinados à castração eletiva. In: Consensos Brasileiros em Leptospirose Animal. J. of Cont. Ed. in An.Sc., v. 14, n. 2, p. 91, 2016.

DAHER, E. F.; ABREU, K. L.; SILVA JUNIOR, G. B. Insuficiência renal aguda associada à leptospirose. *J. Bras. Nefrol.*, v. 32, n. 4, p. 408-415, 2010.

ELLIOT, J.; GRAUER, G. (Ed.). BSAVA manual of canine and feline nephrology and urology. 2. ed. Ames: Blackwell Publishing Professional, 2007. 300 p.

ENRIETTI, M. A. Contribuição ao conhecimento da incidência de leptospirosas em murédeos, caninos e suínos no Paraná. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, p. 311-342, 2001.

FELT, S.A.; WASFY, M.O.; EL-TRASS, W.F.; SAMIR, A.; RAHAMAN, B.A.; BOSHRA, M.; PARKER, T.M.; HATEM, M.E.; EL-BASSIOUNY, A.A.; MURRAY, C.K.; PIMENTEL, G. Cross species surveillance of *Leptospira* in domestic and peri-domestic animals in Mahalla city, Gharbeya Governorate, Egypt. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.84, n.3, p.420-425, 2011.

FONZAR, U.J.V.; LANGONI, H. Geographic analysis on the occurrence of human and canine leptospirosis in the City of Maringá, State of Paraná, Brazil. *Rev.Soc.Bras.Med.Trop.*, v.45, n.1, p. 100 – 105, 2012.

GOLDSTEIN, R. E. Canine leptospirosis. *Vet. Clin. Small Anim.*, v. 40, p. 1091-1101, 2010.

GREENE, C. E; SYKES, J.E.; MOORE, G.E.; GOLDSTEIN, R.E.; SCHULTZ, R.D. Leptospirosis. In: GREENE, C.E. Infectious diseases of the dog and cat. 4. ed. Saunders: Elsevier, p. 431-446, 2012.

GRANT, D.; FORRESTER, S. D. Doenças do rim e ureter. In: BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R. G. Manual Saunder clínica de pequenos animais. 3. ed. São Paulo: Roca, cap. 7, p. 881-916, 2008.

GUERRA, M. Leptospirosis. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 234, 472 – 477. 2009.

HAAKE, D. A.; CHAO, G.; ZUERNER, R. L.; BARNETT, J. K.; BARNETT, D.; MAZEL, M.; MATSUNAGA, J.; LEVETT, P. N; BOLIN, C. A. The Leptospiral

Major Outer Membrane Protein LipL32 Is a Lipoprotein Expressed during Mammalian Infection. *Infection and Immunity*, v. 68, n. 4, p. 2276-2285, 2000.

HARTLEBEN, C. P.; LEAL, F. M.; MONTE, L. G.; HARTWIG, D. D.; SEIXAS, F. K.; VASCONCELLOS, S. A.; BRIHUEGA, B.; DELLAGOSTIN, O. A. Serological analysis by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant antigen LipL32 for the diagnosis of swine leptospirosis. *Current Microbiology*, v. 66, n. 2, p. 106-109, 2013.

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.*, v. 67, n. 2, p. 181-185, 2000.

KIKUTI, M.; LANGONI, H.; NOBREGA, D.N.; CORRÊA, A.P.F.L.; ULMANN, L.S. Occurrence and risk factors associated with canine leptospirosis. *J.Venom. Anim.Toxins.Incl.Trop.Dis.*, v.18, p. 124 – 127, 2012.

KLAASEN, H. L. B. M.; MOLKENBOER, M. J. C. H.; VRIJENHOEK, M. P.; KAASHOEK, M. J. Duration of immunity in dogs vaccinated against leptospirosis with a bivalente inactivated vaccine. *Vet. Microbiol.*, v. 95, p. 121-132, 2003.

KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospirosis vaccines: past, present, and future. *J Postgrad Med*, v. 51, n.3, p. 210 – 214, 2005.

KOIZUMI, N.; MUTO, M.M.; AKACHI, S.; OKANO, S.; YAMAMOTO, S.; HORIKAWA, K.; HARADA, S.; FUNATSUMARU, S.; OHNISHI, M. Molecular and serological investigation of *Leptospira* and leptospirosis in dogs in Japan. *J.of Med.Microbiol.*, v.62, p.630 – 636, 2013.

LANGONI, H.; CABRAL, K.G.; KRONFLY, C.S. Pesquisa de aglutininas antileptospíricas em gatos. *Rev Clín Vet.*, v.17, n.246. 1998.

LANGONI, H.; SOUZA, L.C.; SILVA, A.V.; LUVIZOTTO, M.C.R.; PAES, A.C.; LUCHEIS, S.B. Incidence of leptospiral abortion in Brazilian dairy cattle. *Prev.Vet. Med.*, v.40, p.271-275, 1999.

LANGONI, H.; DE PONTE, M.C.; BARBOSA, D.; MANZI, M.D.P.; DA SILVA, R.C.; MENOZZI, B.D. Pesquisa de anticorpos e DNA de *Leptospira* spp. Em soro canino. *Rev. Vet. e Zoo*, v. 22, n.3, p. 429 – 436, 2015.

LANGSTON, C. E.; HEUTER, K. J. Leptospirosis: a re-emerging zoonotic disease. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, v. 33, p. 791-807, 2003.

LAVINSKY, M. O.; SAID, R. A.; STRENZEL, G. M. R.; LANGONI, H. Seroprevalence of anti-*Leptospira* spp. Antibodies in dogs in Bahia. *Prev. Vet. Med.*, v. 106, p. 79-84, 2012.

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

LEVETT, P.N. Leptospirosis: A forgotten zoonosis. *Clinical and Applied Immunology Reviews*, v.4, p. 435 – 448, 2004.

LPSN, List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Genus *Leptospira*. França, 2015. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/leptospira.html>> Acesso em 06 abril 2016.

MAELE, I. V.; CLAUS, A.; HAESEBROUCK, F.; DAMINET, S. Leptospirosis in dogs: a review with emphasis on clinical aspects. *Vet. Rec.*, v. 163, p. 409-413, 2008.

MAGALHÃES, D. F.; SILVA, J. A.; MOREIRA, E. C.; WILKE, V. M. L.; NUNES, A. B. V.; HADDAD, J. P. A.; MENESES, J. N. C. Perfil dos cães sororeagentes para aglutininas - *Leptospira* em Belo Horizonte, Minas Gerais, 2001/2002. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v. 59, n. 5, p. 1326-1329, 2007.

MAJOR, A.; SCHWEIGHAUSER, A.; FRANCEY, T. Increasing Incidence of Canine Leptospirosis in Switzerland. *In: J. Environ. Res. Public Health*, v.11, p. 7242 – 7260, 2014.

MARTIN, L.E.R; WIGGANS, K.T.; WENNOGLES, S.A.; CURTIS, K.; CHANDRASHEKAR, R.; LAPPIN, M.R. Vaccine-associated leptospira antibodies in client-owned-dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.28, n.3, p. 789 – 792, 2014.

MARTINS, G.; LILENBAUM, W. The panorama of animal leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil, regarding the seroepidemiology of the infection in tropical regions. *BMC Vet. Res.*, v.9, n.237, 2013.

MEITES, E.; JAY, M.; DERESINSKI, S.; SHIEH, W.; ZAKI, S.; TOMPKINS, L.; SMITH, D. Reemerging Leptospirosis, California. *Emerg. Infec. Dis.*, v. 10, p. 407 – 412, 2004.

MÉRIEN, F. A. P.; BARATON, G. S. G. I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.*, v. 30, p. 2219-2224, 1992.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de controle de roedores. Brasília, 2002.131p.

MODOLO, J. R.; LANGONI, H.; PADOVANI, C. R.; SHIMABUKURO, F. H.; MENDONÇA, A. O.; VICTORIA, C.; SILVA, W. B. Investigação soropidemiológica de leptospirose canina na área territorial urbana de Botucatu, São Paulo, Brasil. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v. 43, n. 5, p. 598-604, 2006.

MONAHAN, A. M.; CALLANAN, J. J.; NALLY, J. E. Proteomic Analysis of *Leptospira interrogans* Shed in Urine of Chronically Infected Hosts. *Infection and Immunity*, v. 76, n. 11, p. 4952-4958, 2008.

MORIKAWA, V.M.; BIER, D.; PELLIZZARO, M.; ULLMANN, L.S.; PAPLOSKI, I.A.D.; KIKUTI, M.; LANGONI, H.; BIONDO, A.W.; MOLENTO, M.B. Seroprevalence and seroincidence of *Leptospira* infection in dogs during a one-year period in an endemic urban area in Southern Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.48, n.1, p. 50 – 55, 2015.

NALLY, J. E.; CHOW, E.; FISHBEIN, M. C.; BLANCO, D. R.; LOVETT, M. A. Changes in Lipopolysaccharide O Antigen Distinguish Acute versus Chronic *Leptospira interrogans* Infection. *Infection and Immunity*, v. 73, n. 6, p. 3251-3260, 2005.

OIE, World Organisation for Animal Health. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 6^a ed. World Organisation for Animal Health, Paris, 2012.

PAES, A.C. Leptospirose canina. In: MEGID, J.; RIBEIRO, M.G.; PAES, A.C. Doenças Infecciosas em Animais de Produção e de Companhia. 1^a ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016. p.356 – 377.

PAIXÃO, M.S.; ALVES-MARTINA, M.F.; TENORIO, M.S.; STARKE-BUZETTIC, W.A.; ALVES, M.L.; DA SILVA, D.T.; FERREIRA, A.G.; FLORO E SILVA, M.; SOUSA, L.O.; LUCHEIS, S.B. Serology, isolation, and molecular detection of *Leptospira* spp. from the tissues and blood of rats captured in a wild animal preservation centre in Brazil. *Preventive Veterinary Medicine*, v.115, p. 69 – 73, 2014.

PASTERNAK, J. Biofilmes: um inimigo (in)visível. Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação, p. 36-38, 2009.

PICARDEAU, M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Médecine et maladies infectieuses*, v. 43, p. 1 – 9, 2013.

PICARDEAU, M.; BERTHERAT, E.; JUNCLOES, M.; SKOULLOUDIS, A. N.; DURSKEI, K.; HARTSKEERL, R. A. Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: Current tools and emerging technologies. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 78, p. 1-8, 2014.

QUERINO, A. M.V.; DELBEM, A. C. B.; DE OLIVEIRA, R. C.; DA SILVA, F. G.; MÜLLER, E. E.; FREIRE, R. L.; DE FREITAS, J. C. Fatores de risco associados à leptospirose em cães do município de Londrina – PR. *Semin. Ciênc. Agrár.*, v. 24, n. 1, p. 27-34, 2003.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. Espiroquetas. In: _____. *Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas*. São Paulo: Artmed, 2005. chap.31, p.179-188.

REN, S.; FU, G.; JIANG, X.; ZENG, R.; MIAO, Y.; XU, H.; ZHANG, Y.; XIONG, H.; LU, G.; LU, L.; JIANG, H.; JIA, J.; TU, Y.; JIANG, J.; GU, W.; ZHANG, Y.; CAI, Z.; SHENG, H.; YIN, H.; ZHANG, Y.; ZHU, G.; WAN, M.; HUANG, H.; QIAN, Z.; WANG, S.; MA, W.; YAO, Z.; SHEN, Y.; QIANG, B.; XIA, Q.; GUO, X.; DANCHIN, A.; GIRON, I. S.; SOMERVILLE, R. L.; WEN, Y.; SHI, M.; CHEN, Z.; XU, J.; ZHAO, G. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature*, v. 422, n. 6934, p. 888-893, 2003.

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

Leptospira spp. DNA from aborted bovine fetuses. Vet. Microbiol., v. 87, p. 139-147, 2002.

RISTOW, P.; BOURHY, P.; KEMEIS, S.; SCHMITT, C.; PREVOST, M. C.; LILENBAUM, W.; PICARDEAU, M. Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. Microbiology, v. 154, p. 1309-1317, 2008.

RODRIGUES, A.M.A; VASCONCELOS, S.A.; GONÇALES, A.P.; MORAES, Z.M.; SOUZA, G.O.; HAGIWARA, M.K. Antibody revealed by growth inhibition test of leptospires in vitro (GIT) against serovars Canicola, Icterohaemorrhagiae and Copenhageni in adult dogs recaccinated annually with commercial vaccine containing serovars Canicola, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa and Pomona bacterins. Pesquisa Veterinária Brasileira, v.33, n.5, p. 634 – 697, 2013.

ROJAS, P.; MONAHAN, A.M.; SCHULLER, S.; MILLER, I.S.; MARKEY, B.K.; NALLY, J.E. Detection and quantification of leptospires in urine of dogs: a maintenance host for the zoonotic disease leptospirosis. Eur. J. Clin.Microbiol.Infec.Dis. v.29, p. 1305 – 1309, 2010.

SAS Institute. 2011. SAS/STAT User's Guide. Version 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC.

SCHREIBER P.; MARTIN, V.; NAJBAR, W.; SANQUER, A.; GUEGUEN, S.; LEBREUX, B. Prevention of renal infection and urinary shedding in dogs by *Leptospira* Vaccination. Vet. Microbiol.,v. 108, p. 113-118, 2005.

SCHULLER, S.; FRANCEY, T.; HARTMANN, K.; HUGONNARD, M.; KOHN, B.; NALLY, J.E.; SYKES, J. European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats. J.of Small Animal Practice, v.56, p.159 – 179, 2015.

SEGURO, A. C.; ANDRADE, L. Pathophysiology of leptospirosis. Shock, v. 39, n. 7, p. 17-23, 2013.

SHIMABUKURO, F. H.; DOMINGUES, P. F.; LANGONI, H. et al. Pesquisa de suínos portadores renais de leptospirosas pelo isolamento microbiano e reação em cadeia pela polimerase em amostras de rins de animais sorologicamente positivos e negativos para leptospirose. Brazilian journal of Veterinary Research and Animal Science, v. 40, p. 243-253, 2003.

SILVA-ZACARIAS, F. G. da; MARQUES, D. R. C.; CARDOSO, M. J. L.; FREITAS, J. C.; ZACARIAS JUNIOR, A.; ZAMARIAN, T. P. Frequência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual do Norte do Paraná – UENP. Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR, Umuarama, v. 17, n. 2, p. 91-95, 2014.

SILVA, W. B.; SIMÕES, L. B.; PADOVANI, C. R.; LANGONI, H.; LOPES, A. L. S.; MODOLO, J. R. Inquérito epidemiológico e distribuição espacial da leptospirose canina em área territorial urbana da cidade de Botucatu, São Paulo. Vet. Zootec., v. 16, p. 656-668, 2009.

SMYTHE, L.; ADLER, B.; HARTSKEERL, R. A.; GALLOWAY, R. L.; TURENNE, C. Y.; LEVETT, P. N. Classification of *Leptospira* genomospecies 1, 3, 4 and 5 as *Leptospira alstonii* sp. nov., *Leptospira vanthielii* sp. nov., *Leptospira terpstrae* sp. nov. and *Leptospira yanagawae* sp. nov., respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 63, p. 1859-1862, 2013.

TAVARES, D.C.; SANTOS, R.F.; SOUZA, F.F.; ASSIS, N.A.; MATHIAS, L.A.; TONIOLLO, G.H. Inquérito sorológico para *Leptospira* spp. em canis comerciais da microrregião de Ribeirão Preto, SP. In: Consensos Brasileiros em Leptospirose Animal. J. of Cont. Ed. in An. Sc., v. 14, n. 2, p. 91, 2016.

TAYLOR, D.; KARAMADOUKIS, L. Plasma exchange in severe leptospirosis with multi-organ failure: a case report. *J. Med. Case Rep.*, v. 7, p. 169, 2013.

TESSEROLLI, G. L.; ALBERTI, J. V. A.; AGOTTANI, J. V. B.; FAYSANO, L.; WARTH, J. F. G. Soroprevalência para leptospirose em cães de Curitiba, Paraná. *Rev. Acad. Cienc. Agrar. Ambient.*, v. 3, n. 4, p. 35-38, 2005.

VIEGAS, S. A. R. A.; TAVARES, C. H. T.; OLIVEIRA, E. M. D.; DIAS, A. R.; MENDONÇA, F. F.; SANTOS, M. F. P. Investigação sorológica para leptospirose em cães errantes na cidade de Salvador – Bahia. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.*, v. 2, n. 1, p. 21-30, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. Malta, 2003. 110p.

ZAKERI, S.; KHORAMI, N.; GANJI, Z. F.; SEPAHIAN, N.; MALMASI, A.; GOUYA, M. M.; DJADID, N. D. *Leptospira wolffii*, a potential new pathogenic *Leptospira* species detected in human, sheep and dog. *Infect. Genet. Evol.*, v. 10, p. 273-277, 2010.

ZIMMERMAN, J. J.; KARRIKER, L. A.; RAMIREZ, A.; SCHWARTZ, K. J.; STEVENSON, G. W. *Diseases of Swine*. 10 ed. Inglaterra, Chichester. Ed. John Wiley & Sons, Inc., p. 769-772, 2012

ZUERNER, R. L. Physical map of chromosomal and plasmid DNA comprising the genome of *Leptospira interrogans*. *Nucleic Acids Research*, v. 19, n. 18, p. 4857-4860, 1991