

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 ($9,8\text{m/s}^2$)

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).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico

O primeiro relato de leptospirose em cães ocorreu em 1850 por Hafer, 30 anos antes da doença ser descoberta em seres humanos. Em 1858, na Alemanha, foi descrita uma epizootia em cães, na época denominada enfermidade de Stuttgart. Em 1886, Weil caracterizou a doença como síndrome febril com hemorragias e icterícia em humanos, sendo assim, denominada doença de Weil (ENRIETTI, 2001; PAES, 2016).

Stimson em 1907, nos EUA, visualizou espiroquetas em colorações a base de prata em formatos de ganchos terminais, chamando-as de *Spirochaeta interrogans* devido sua semelhança ao ponto de interrogação (PAES, 2016).

Noguchi em 1918, no Japão, definiu o gênero *Leptospira*. Em seguida, Ido, denominou *Leptospira icterohaemorrhagiae* como agente da doença de Weil, e identificou o agente da febre dos sete dias, conferindo o nome de *Leptospira hebdomadis*. A partir dessa data, foram descobertos novos sorovares em todo o mundo (ENRIETTI, 2001; PAES, 2016).

Em 1931, Klarenbeek e Schuffner na Holanda, descreveram o sorovar Canicola para um sorotipo canino diferente. Em 1957, foi identificada a predominância dos sorovares Canicola e Icterohaemorrhagiae em cães na Inglaterra (PAES, 2016).

Azevedo em 1945 no Brasil realizou o diagnóstico da leptospirose em cães. Em 1948, Guida e colaboradores, identificaram cães com leptospirose pelos sorovares Canicola e Icterohaemorrhagiae. Santa Rosa, Pestana de Castro e Caldas, em 1962, isolaram o sorovar Icterohaemorrhagiae em cães (PAES, 2016).

2.2 Agente etiológico

As leptospirosas tem formato de espiroqueta e são bactérias aeróbicas, gram negativas, delgadas, flexíveis e filamentosas com 0,1 a 0,2 µm de largura e 6 a 12 µm de comprimento (GOLDSTEIN, 2010). Possuem formato em espiral, com um gancho terminal, e um cilindro composto por citoplasma ou

protoplasma envolto por uma membrana interna. Este cilindro envolve um filamento axial central composto de flagelos periplasmáticos responsável pela motilidade. O cilindro periplasmático e o filamento axial central são envolvidos por uma membrana externa. A motilidade ocorre devido a movimentos de extensão e flexão, enquanto ocorre rotação ao longo do filamento axial (LANGSTON; HEUTER, 2003; GOLDSTEIN, 2010).

A bactéria é facilmente visualizada por microscopia de campo escuro em preparações a fresco. Apesar de serem classificadas como gram-negativas, apresentando estrutura da parede celular lipídica, as leptospiros não são coradas pela técnica de Gram, Giemsa e corante de base Romanowsky, devido às suas dimensões reduzidas. (LEVETT, 2001).

A parede celular das leptospiros é composta por peptideoglicanos associados à membrana interna, que é composta de lipoproteínas e proteínas de transmembrana como a peptidase e ImpL63 (GREENE et al., 2012). O envoltório externo é rico em lipopolissacarídeos (LPS), tais como o LipL21, LipL32, LipL36 e LipL41 e mucopeptídeo, sendo assim, essa variabilidade de composição estrutural determina os distintos sorovares e a produção de anticorpos pelo hospedeiro. Devido aos altos teores de lipídios da membrana celular, são exigidas colorações especiais à base de sais de prata, para visualização da bactéria, que assume coloração enegrecida (QUINN et al., 2005; PAES, 2016).

As condições essenciais para a sobrevivência da *Leptospira* spp. no ambiente são umidade e temperaturas elevadas. Aproximadamente 28 a 30°C de temperatura e pH 7,6, sob aerobiose, são as condições ideais para crescimento e multiplicação da espécie (LEVETT, 2001). A membrana citoplasmática da leptospira é muito sensível ao ressecamento, na ausência de umidade pode haver morte bacteriana em poucos minutos, sendo necessários substratos úmidos para favorecer um ambiente adequado para sua manutenção e sobrevivência (QUINN et al., 2005).

Zuerner foi o primeiro pesquisador a demonstrar o genoma de uma espiroqueta em 1991. Utilizando em seu estudo *L. interrogans* sorovar Pomona por ser uma das leptospiros patogênicas mais comumente encontradas no mundo. Os resultados demonstraram genoma de aproximadamente 5.000 kb

de tamanho, com potenciais genes codificadores de proteínas (REN et al., 2003).

Estudos sugerem que a membrana externa das leptospiros tem um perfil de proteínas complexo. Até o início do século XXI, somente algumas proteínas da membrana haviam sido caracterizadas. Nos últimos anos, diversas proteínas de superfície das leptospiros têm sido identificadas e caracterizadas, incluindo as proteínas da membrana externa, LipL36, LipL41, LipL32, Loa22, proteínas da família Len e as proteínas Lig. A expressão das proteínas da membrana externa sofre variações de acordo com a patogenicidade da bactéria (HARTLEBEN et al., 2013).

De acordo com Haake et al. (2000), a proteína mais encontrada na membrana externa das leptospiros é denominada como LipL32. Pesquisadores compararam as características da membrana externa da mesma bactéria em situações diferentes e foi concluído que a LipL32 é expressa em altos níveis não somente durante o cultivo bacteriano, mas também durante a infecção de mamíferos, sendo sua sequência e expressão altamente conservadas entre as espécies patogênicas (NALLY et al., 2005).

Em outro estudo, Monahan, Callanan e Nally (2008) pesquisaram pela primeira vez o proteoma de leptospiros disseminadas na urina de animais cronicamente infectados. A análise do proteoma das leptospiros isoladas da urina comparada com a do proteoma de leptospiros cultivadas *in vitro* confirmou as diferenças entre a expressão de proteínas e de antígenos. A diminuição da expressão de antígenos observada na bactéria da amostra de urina sugere que a expressão desses antígenos pode ser regulada em hospedeiros de manutenção manifestando doença crônica, podendo estar relacionada à liberação das leptospiros dos tecidos para a urina. Desta forma, a expressão de proteínas e antígenos pelas leptospiros pode variar dependendo das condições do hospedeiro, sendo ele de manutenção ou acidental.

2.3 Taxonomia

Leptospira spp. pertence ao gênero *Leptospira*, família *Leptospiraceae*, ordem *Spirochaetales*. O termo leptospira deriva do grego *lepto* (delgado) e do latim *spira* (espiral), o que originou o termo espiral delgado (PAES, 2016).

Até 1989 se conheciam somente duas espécies: *Leptospira interrogans* (*sensu lato*), que agrupava as bactérias patogênicas; e *Leptospira biflexa* (*sensu lato*), que incluía bactérias saprófitas, não patogênicas, e provenientes do ambiente. Essa classificação era baseada em determinantes antigênicos da bactéria, classificadas em sorogrupos e sorotipo. O sorovar tem importância epidemiológica e clínica, uma vez que é possível a infecção de um mesmo indivíduo por sorovares distintos. Alguns sorovares são associados a determinados reservatórios animais, o que é importante para o rastreamento de fontes de infecção (LEVETT, 2004; SEGURO; ANDRADE, 2013; PAES, 2016).

Nas últimas décadas, com base na diferenciação dos antígenos de superfície das espécies de leptospira, a classificação fenotípica em sorovar, foi substituída pela classificação antigênica, sendo que os sorovares com antígenos comuns são caracterizados em sorogrupos. Atualmente, mais de 250 diferentes sorovares são reconhecidos, agrupados em 24 sorogrupos, dos quais pelo menos dez sorovares são patogênicos para cães (ADLER, DE LA PEÑA MONCTEZUMA, 2010; GOLDSTEIN, 2010).

A determinação dos sorogrupos e sorotipos por métodos antigênicos ainda tem valor clínico e epidemiológico, apesar de não ter respaldo taxonômico nos casos em que a bactéria não pode ser isolada e classificada geneticamente. Entretanto, alguns sorovares do mesmo sorogrupo podem apresentar reatividade cruzada, dificultando o diagnóstico sorológico (PAES, 2016).

Alterações taxonômicas foram realizadas de acordo com estudos recentes da homologia do DNA, e detalhada na List of Prokaryotic Names With Standing in Nomenclature (LPSN), sendo que o gênero *Leptospira* passou a ser classificado em genoespécies (genomoespécies). Atualmente são reconhecidas 23 espécies por homologia de DNA, dentre elas as não patogênicas: *L. biflexa* (*sensu stricto*), *L. meyeri*, *L. wolbachii*; *L. indonii*, *L. vanthielii*, *L. terpstrae* e *L. yanagawae*; as intermediárias ou oportunistas: *L. inadai*, *L. fainei*, *L. broomii*, *L. wolfii* e *L. licerasiae*; e as patogênicas: *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. alexanderi*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. weilli*, *L. kmetyi*, *L. mayottensis* e *L. alstonii* (SMYTHE et al., 2013; LPSN, 2015; PAES, 2016).

A classificação genotípica está baseada nas sequências dos genes que codificam o ácido nucleico. As novas genoespécies *L. interrogans* e *L. biflexa* (*stricto sensu*) não correspondem às duas espécies prévias (*lato sensu*) assim denominadas e, nelas bem como em muitas das outras novas espécies, coexistem sorovares patogênicos e não patogênicos. Desta forma, os sorogrupos e os sorovares clássicos guardam relação com as novas genoespécies. Portanto, esta nova classificação, embora taxonomicamente correta, é problemática para o microbiologista clínico, porque é claramente incompatível com o sistema de aglutinações em sorogrupos e sorovares, que tão bem serviu à clínica e a epidemiologia por tantos anos (LEVETT, 2004; CERQUEIRA; PICARDEAU, 2009).

Em diversos estudos com cães, os sorovares mais encontrados foram Canicola e Icterohaemorrhagiae. Com a introdução da vacina contendo estes dois sorovares, há mais de 50 anos, ocorreu uma redução no número de casos relatados de leptospirose canina pelos sorovares Canicola e Icterohaemorrhagiae (MODOLO et al., 2006; MAELE et al., 2008). Em contraste, outros sorovares têm sido descritos envolvidos na leptospirose canina, particularmente Grippotyphosa, Bratislava e Pomona (MAELE et al., 2008).

2.4 Epidemiologia

A leptospirose possui distribuição mundial, estando presente em todos os continentes exceto na Antártica. Ocorre com maior frequência nas regiões tropicais, cuja condições de umidade e temperatura contribuem para a sobrevivência da bactéria no ambiente. A enfermidade também é comum em países subdesenvolvidos e/ou em desenvolvimento, pela precariedade dessa infraestrutura sanitária. No Brasil, a leptospirose é considerada uma doença endêmica presente em todo território nacional (MODOLO et al., 2006; MARTINS; LILENBAUM, 2013).

Em determinadas regiões é possível observar o efeito sazonal, na ocorrência da doença. No verão aumentam o número de casos de leptospirose, provavelmente em decorrência de altos índices pluviométricos, em contraste

com o inverno (JOUGLARD; BROD, 2000; BLAZIUS et al., 2005; FONZAR; LANGONI, 2012; KIKUTI, et al., 2012).

As infecções são observadas em cães provenientes de ambientes rurais ou suburbanos, que são expostos e/ou ingerem água de lagos ou córregos contaminados. O número de casos provenientes de cães urbanos vem aumentando, provavelmente pelo contato com roedores infectados ou com a urina desses. A leptospirose também tem sido diagnosticada em cães que vivem em canis sem condições sanitárias adequadas (MODOLO et al., 2006; MORIKAWA, et al., 2015).

A infecção ocorre pelo contato direto com a urina ou tecidos de animais infectados, durante a manipulação, ou pelo contato indireto a partir da água ou solo úmido previamente contaminados pela urina de um animal infectado (ZAKERI et al., 2010; LAVINSKY et al., 2012). Outras formas de transmissão menos comuns são a transmissão transplacentária (FELT et al., 2011), e a inalação de aerossóis contendo gotículas de água contaminada (LEVETT, 2001). A leptospira penetra ativamente ao entrar em contato com mucosas, principalmente oral e ocular, ou soluções de continuidade da pele. Quando há exposição prolongada, durante banhos em rios, lagos, ou enchentes, também pode haver penetração de leptospiros pela pele íntegra (FELT et al., 2011).

Quando a leptospira está fora do hospedeiro, ela não é capaz de se multiplicar. Para que a transmissão indireta ocorra, as condições ambientais devem favorecer a sobrevivência das leptospiros, como presença de água parada. Na água, a bactéria forma um biofilme em superfícies orgânicas ou inorgânicas, contendo colônias do micro-organismo. Solo favorável à manutenção da bactéria possui pH neutro a levemente alcalino. Estas espiroquetas sobrevivem na urina não diluída com pH ácido (pH 5,0 a 5,5), porém o pH alcalino promove ambiente mais adequado. A temperatura ambiental para a sobrevivência varia entre 0 e 25°C, enquanto que o congelamento, dessecação e exposição a raios ultravioletas diminuem a viabilidade bacteriana (LEVETT, 2001; GOLDSTEIN, 2010).

Quando a bactéria invade um novo meio, como por exemplo, o meio ambiente, o hospedeiro ou superfícies abióticas, ela pode assumir duas formas: a forma planctônica, na qual a bactéria circula isoladamente ou a forma de biofilme, quando bactérias isoladas fazem adesão às superfícies abióticas

(plásticos, vidros, metais e minerais) ou bióticas (plantas e tecidos animais) e começam a se agregar e a produzir uma matriz onde microcolônias são formadas. A partir da formação de microcolônias o biofilme é gerado (PASTERNAK, 2009).

Ristow e colaboradores em 2008 estudaram pela primeira vez a capacidade de formação de biofilme pelas leptospiros. A capacidade de agregação celular e formação de biofilme podem ser responsáveis pelo prolongamento do tempo de sobrevivência, representando um importante papel na manutenção das bactérias em diferentes habitats.

A capacidade de formação de biofilmes pode ter grande relevância na manutenção dos portadores crônicos como reservatórios da doença, pois os microorganismos se tornam mais resistentes aos antibióticos, apresentando sobrevivência mais duradoura (RISTOW, et al., 2008).

A leptospira é propagada no ambiente pelos hospedeiros reservatórios assintomáticos, que eliminam a bactéria pela urina por vários meses ou por toda a vida. Várias espécies podem atuar como reservatórios, tanto domésticas como selvagens (LEVETT, 2001).

O reservatório primário (ou de manutenção) é altamente susceptível à infecção, ocorrendo principalmente pelo contato direto entre os animais durante a fase inicial da vida. Os reservatórios primários mantêm a infecção renal e eliminam leptospiros pela urina, sendo os maiores responsáveis pela contaminação ambiental. O reservatório secundário (ou acidental) tem baixa susceptibilidade à infecção, as lesões e os sinais clínicos são mais frequentes e mais graves, porém se tornam transmissores pouco eficientes (KLAASEN et al., 2003; MAELE et al., 2008).

Os principais reservatórios são os roedores de hábitos sinantrópicos. Secundariamente aos roedores, os cães representam importante papel na epidemiologia da leptospirose humana devido à proximidade com os seres humanos (LAVINSKY et al., 2012; TAYLOR; KARAMADOUKIS, 2013; PICARDEAU et al., 2014). A espécie *Rattus norvegicus* (ratazana de esgoto) é o reservatório primário das leptospiros pertencentes ao sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* e *Ballum*, sendo capaz de manter a infecção e eliminar leptospiros pela urina por longo tempo (PAIXÃO et al., 2014). Outros roedores

considerados importantes reservatórios são o rato – preto (*Rattus rattus*) e o camundongo (*Mus musculus*) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

É importante ressaltar que a correlação ou predileção entre reservatórios e sorovares podem variar de acordo com a região. O estudo epidemiológico dessas variações é de grande importância. Os bovinos, suínos, ovinos, caprinos, equinos também podem atuar como fontes de infecção (LANGONI et al., 1999; SILVA et al., 2009; MARTINS; LILENBAUM, 2009; BARBANTE et al., 2014).

Modolo et al. (2006) realizaram um estudo com 775 cães do município de Botucatu, SP, que participaram da campanha antirrábica. Nestes animais houve grande prevalência de cães reagentes à técnica de SAM, provavelmente devido aos hábitos de marcação territorial e comportamento sexual, expondo-se mais ao patógeno do que as fêmeas. Neste mesmo estudo também ocorreu maior prevalência em cães sem raça definida, quando comparado a cães de raças puras. Em estudo similar, Magalhães et al. (2007) obtiveram a mesma conclusão, observando que cães machos e sem raça definida apresentaram maior risco de infecção.

Estudos realizados com felinos domésticos descrevem estes animais como refratários a doença. Entretanto, Langoni et al. (1998) detectaram aglutininas anti-leptospiras em nove amostras de soro de gatos (9/200), de várias regiões do país, com títulos de anticorpos, variáveis de 100 a 400 UI, consideram-se como reagentes títulos iguais ou superiores a 100 UI. Os sorovares prevalentes nos felinos foram: 4 (44,4%) *Icterohaemorrhagiae*, 2 (22,2%) *Patoc*, 1 (11,11%) *Canicola*, 1 (11,11%) *Gryppotyphosa* e 1 (11,11%) *Andamana*.

2.5 Patogenia

As leptospiras são capazes de invadir membranas mucosas intactas como a oro-nasal, ocular e tegumento, lesionadas ou úmidas por longos períodos. A bactéria multiplica-se rapidamente após atingir a corrente sanguínea e se dissemina para diversos tecidos incluindo rins, fígado, baço, sistema nervoso central, olhos e trato genital (MAELE et al., 2008; GOLDSTEIN, 2010).

Em geral, o período de incubação é de sete dias, embora dependa da dose infectante, condições de exposição natural, patogenicidade da linhagem e imunidade do hospedeiro. Na fase aguda ocorre leptospiremia, durando em média de uma a duas semanas, sendo o período em que aparecem os sinais clínicos (GREENE et al., 2012).

As leptospirosas apresentam diversos fatores de patogenicidade que estão associados à capacidade de invasão no hospedeiro e de lesão nos tecidos atingidos. A presença de endoflagelo na bactéria possibilita a motilidade em meios viscosos, facilitando a invasão e a disseminação após a infecção inicial. As fibronectinas são proteínas de membrana que interagem com o tecido do hospedeiro, conferindo aderência às leptospirosas na mucosa invadida. A esfingomielinase H forma poros na célula do hospedeiro, promovendo a penetração celular e agravando lesões celulares no organismo acometido. Já os peptidoglicanos ativam as células endoteliais vasculares, aumentando a adesão de neutrófilos e levando à inflamação sistêmica do endotélio vascular. Os LPS promovem a aderência de neutrófilos às células endoteliais vasculares promovendo a ativação plaquetária, ativam os macrófagos, estimulando a produção de interleucinas (IL-1 e IL-10) e também fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Os LPS causam lesões teciduais e vasculite, levando à redução do fluxo sanguíneo para os tecidos e órgão afetados, aumentando a permeabilidade vascular, além de induzir a trombocitopenia e coagulação intravascular disseminada (GREENE, et al., 2012; PAES, 2016).

As leptospirosas não induzem resposta adequada do sistema imune do hospedeiro infectado e a ação da maioria dos antimicrobianos não consegue alcançar o interior das células tubulares renais, facilitando a sobrevivência e multiplicação dessas bactérias, tornando os rins mais susceptíveis à infecção. Os anticorpos também têm dificuldade de passar a barreira glomerular, conferindo um vazio imunológico aos rins, resultando em longos períodos de permanência desse micro-organismo no sistema renal (ELLIOT; GRAUER, 2007; PAES, 2016).

A leptospirose é a eliminação da bactéria pela urina de forma intermitente. A eliminação do micro-organismo pela urina inicia-se após 72 horas pós-infecção e se estende por semanas ou meses em animais domésticos e até mesmo por toda a vida em roedores (; PAES, 2016).

Os quadros de hemorragia, edema, congestão e vasculite generalizada ocorrem devido à aderência de fagócitos, a liberação de citocinas e agregação plaquetária induzida pela presença de LPS da membrana da bactéria, concomitantemente com a multiplicação ativa do agente no endotélio vascular (SCHULLER et al., 2015; PAES, 2016).

Os rins são um dos principais órgãos-alvo afetados na leptospirose. As lesões renais são causadas diretamente pela ação das leptospirosas, bem como pela resposta imune do próprio hospedeiro. A insuficiência (ou injúria) renal aguda (IRA), como é conhecida, é uma síndrome caracterizada pelo declínio abrupto da função renal que resulta na incapacidade dos rins em excretar resíduos metabólicos e controlar o equilíbrio eletrolítico e ácido básico (GRANT, FORRESTER, 2008; SEGURO, ANDRADE, 2013).

Segundo Elliot e Grauer (2007) na IRA estão envolvidos basicamente mecanismos de alterações estruturais e bioquímicas que culminam com comprometimento vascular e celular, descamação do epitélio tubular e obstrução intraluminal e inflamação que induzem a uma queda na funcionalidade renal. As leptospirosas invadem os capilares renais e o interstício do órgão, multiplicam-se e persistem nas células epiteliais tubulares resultando em leptospiúria. As lesões nesses locais levam à IRA, levando à diminuição da filtração glomerular por edema, prejudicando a perfusão sanguínea renal. Os rins sofrem vasculite, as lesões endoteliais causam isquemia no parênquima renal, seguido de necrose celular e infartos renais. Podem levar à nefrite intersticial, pielonefrite, necrose tubular aguda e glomerulonefrite por depósito de imunocomplexos. A uremia gerada pelo decréscimo de filtração glomerular potencializa a vasculite e conseqüentes hemorragias (SCHULLER et al., 2015; PAES, 2016).

A IRA na leptospirose apresenta oligúria mas com níveis séricos de potássio diminuídos, pois há lesão do túbulo proximal, determinando a diminuição de reabsorção tubular de sódio. O aumento da secreção de potássio no túbulo distal é causado pelo fluxo urinário intenso e elevado aporte de sódio do túbulo distal. Sendo que em cães, a hipercalemia sérica desenvolve-se somente na fase terminal da falha renal oligúrica (PAES, 2016).

Ácidos graxos insaturados da fração glicolipídica das leptospirosas, inibem a bomba de sódio-potássio adenosina trifosfato (Na, K ATPase), o que contribui

para a perda de potássio urinário observada em muitos cães com leptospirose (ANDRADE et al., 2007). Alterações como bicarbonatúria, glicosúria, e excreção de ácido úrico e fosfato também são observadas, podendo persistir uma deficiência em concentrar a urina por longos períodos (DAHER; ABREU; SILVA JUNIOR, 2010).

A lesão renal na leptospirose é uma combinação de lesões tubulares agudas e nefrite intersticial. A membrana externa da bactéria possui uma lipoproteína chamada LipL 32 que quando em contato com as células tubulares renais, se ligam ao receptor Toll-like2 (TRL-2), induzindo a ativação do fator nuclear kappa β expressando genes inflamatórios a partir de RNA mensageiro, aumentando a produção de óxido nítrico, proteínas com quimiotaxia à monócitos e TNF- α , estimulando também a produção de IL-1. A necrose tubular aguda reflete os efeitos tóxicos dos LPS das leptospiros e da lipoproteína LipL 32, e também os efeitos indiretos da desidratação, hipovolemia e isquemia por perdas iônicas e incapacidade dos rins em concentrar urina (PAES, 2016).

As leptospiros invadem os capilares renais e o interstício do órgão, multiplicam-se e persistem nas células epiteliais tubulares resultando em leptospiúria. Essas lesões levam à IRA, com a diminuição da filtração glomerular por edema, prejudicando a perfusão sanguínea renal. Os rins sofrem vasculite, as lesões endoteliais causam isquemia no parênquima renal, seguido de necrose celular e infartos renais. Podendo levar à nefrite intersticial, pielonefrite, necrose tubular aguda e glomerulonefrite por depósito de imunocomplexos. A uremia gerada pelo decréscimo de filtração glomerular potencializa a vasculite e consequentes hemorragias (PAES, 2016).

A creatinina é excretada exclusivamente pelos rins, após a sua liberação pelo tecido muscular. A quantidade filtrada é igual à excretada e não é reabsorvida pelos túbulos renais, refletindo a filtração dos glomérulos. Ou seja, em uma determinada situação onde há queda da atividade glomerular, ocorre acúmulo da substância com elevação da concentração sérica. O prognóstico dos cães com leptospirose pode ser determinado pela preservação da função renal (PAES, 2016).

Infecções em cães pelos sorovares Canicola, Bratislava e Grippotyphosa estão associadas às alterações clínicas predominantemente renais, enquanto

os sorovares Icterohaemorrhagiae e Pomona levam ao maior acometimento hepático (GREENE et al., 2012).

O fígado é o segundo órgão mais afetado pelas leptospirosas, onde disfunções hepáticas graves ocorrem por lesões vasculares, que determinam hemorragias, formação de trombos e infartos. Podem-se encontrar sequelas como hepatite crônica e cirrose hepática. Como consequências das lesões hepáticas, há grande liberação de pigmentos biliares na circulação, sendo potencialmente nefrotóxicos e complicando ainda mais o quadro de disfunção renal (PAES, 2016).

Os pulmões são os órgãos menos acometidos pelas leptospirosas, porém a lesão pulmonar aguda é resultado da ação mecânica do micro-organismo nas células endoteliais de revestimento dos vasos do tecido pulmonar. Muitos animais evoluem para óbito por edema pulmonar, hemorragias pulmonares e pneumonia (PAES, 2016).

A rabdomiólise ainda é pouco estudada na leptospirose, porém muito importante, pois causa ruptura de células do músculo esquelético, com extravasamento de creatinina-quinase e mioglobina para o plasma. A mioglobina é filtrada pelos glomérulos, lesando a membrana basal glomerular e obstruindo os túbulos renais (PAES, 2016).

O prognóstico dos animais com leptospirose está relacionado com o nível de imunoglobulinas circulantes nos primeiros sete dias pós-infecção. Cães com baixos títulos de imunoglobulinas anti-Leptospira (IgM e IgG) tendem a desenvolver doença clínica renal e/ou hepática (dependendo do sorovar infectante). Os animais com moderados níveis dessas imunoglobulinas apresentam infecções subclínicas, moderada leptospirose e até ausência de leptospirose. Porém, os animais com altos títulos frequentemente não desenvolvem sinais clínicos e eliminam as leptospirosas em poucos dias após a infecção (PAES, 2016).

2.6 Clínica

Os sinais clínicos encontrados em cães com leptospirose variam de acordo com a imunidade do hospedeiro, fatores ambientais, *status* vacinal e a

virulência do sorovar infectante (TESSEROLLI et al., 2005; MAELE et al., 2008; GREENE et al., 2012).

Na infecção aguda os primeiros sinais no cão são febre (39,5°C a 40°C) e dores musculares generalizadas. Após esta fase inicial se observa quadros eméticos, rápida desidratação e colapso vascular periférico. Taquipnéia, pulso rápido e irregular, e redução da perfusão capilar são observados. As alterações de coagulação e injúrias vasculares são também observadas clinicamente pela presença de hemorragias pulmonares, hematêmese, hematúria, hematoquesia, melena, epistaxe e petéquias (MAELE et al., 2008; SEGURO; ANDRADE, 2013).

Nos casos em que a falência renal e/ou hepática ocorre, as mucosas se tornam ictéricas, e o paciente se encontra prostrado, deprimido e hipotérmico. Icterícia ou aumento de bilirrubina sérica ocorrem em cães com a forma aguda da doença. Colestase intra-hepática devido à inflamação hepática é observada quando as fezes deixam de ser marrons e passam a ter coloração acólicas. Pacientes que apresentem hepatite crônica ativa ou fibrose hepática como sequela da leptospirose, irão apresentar sinais como inapetência crônica, perda de peso, ascite, ictericia e encefalopatia hepática. A hepatite crônica progressiva pode ocorrer em casos onde não há sinais clínicos compatíveis com o envolvimento de outros órgãos (ENRIETTI, 2001; MAELE et al., 2008; PAES, 2016).

Infecções agudas são caracterizadas por anorexia, êmese, desidratação e polidipsia. Nestes casos, a temperatura retal encontra-se dentro dos limites de referência, e a perda de peso está associada à redução do apetite devido à hiperestesia pela inflamação ou uremia. Na palpação abdominal os animais manifestam desconforto devido ao processo inflamatório visceral. Os rins podem estar de tamanhos normais ou um pouco aumentados e doloridos à palpação. Tosse e distrição respiratória podem ser acompanhadas de conjuntivite, rinite e tonsilite. A função renal sofre deterioração identificada pela presença de anúria ou oligúria. A urina torna-se de coloração escura (popularmente denominada cor de “coca-cola”), ocorrendo diminuição da frequência de micções. Animais que sobrevivem à infecção voltam a apresentar função renal normal após duas ou três semanas, ou desenvolvem poliúria compensatória crônica (GREENE et al., 2012; PAES, 2016).

Em humanos, a leptospirose pode apresentar-se de forma clínica com febre, polidipsia, anorexia, dores musculares, principalmente em panturrilhas. Há acometimento renal, devido à colonização das leptospiros no parênquima renal, gerando uma injúria renal aguda (nefrite). Em seguida ocorre acometimento hepático, inicialmente com icterícia e posteriormente piora do quadro icterico, ocorrendo como consequência a piora do quadro renal. Com isso, os humanos infectados irão apresentar azotemia, oligúria com posterior poliúria. Pode ocorrer também miocardite, identificada por alterações eletrocardiográficas. Alguns humanos, porém, desenvolvem uma forma clínica da doença, caracterizada por estado febril, e em alguns casos icterícia (ENRIETTI, 2001; MAELE et al., 2008).

2.7. Diagnóstico

2.7.1 Aspectos laboratoriais

Cães acometidos pela leptospirose podem ser diagnosticados com base nos sinais clínicos associados ao histórico compatível com a doença. Alterações laboratoriais também podem auxiliar no diagnóstico. O hemograma apresenta leucocitose por neutrofilia, com desvio à esquerda, anemia e trombocitopenia, sendo essa última consequência de vasculite, coagulação intravascular disseminada e uremia, pois a trombocitopenia é inversamente proporcional aos níveis séricos de ureia (PAES, 2016).

A bioquímica sérica revela azotemia, enzimas hepáticas elevadas e alterações eletrolíticas. O comprometimento renal é constatado pela elevação dos níveis de ureia sérica, e a elevação da creatinina como resultado da diminuição da filtração glomerular (PAES, 2016). A disfunção hepática pode ser demonstrada pela elevação de ALT (alanina aminotransferase), FA (fosfatase alcalina) e concentração total de bilirrubina. O aumento sérico de bilirrubina pode prejudicar a filtração glomerular, causando efeitos nefrotóxicos. A creatinina quinase (CK) pode encontrar-se aumentada devido à miosite (ADIN; COWGILL, 2000; PAES, 2016). Pode-se observar também hiponatremia, hipocloremia, hiperfosfatemia e hipocalemia em cães com leptospirose aguda e insuficiência renal aguda (ANDRADE et al., 2007; PAES, 2016).

Os exames de imagem também auxiliam no diagnóstico da leptospirose. No exame ultrassonográfico o sistema urinário mostra renomegalia, pielectasia, aumento da ecogenicidade cortical, acúmulo de líquido perirenal e sinal medular, ou aumento da ecogenicidade. A banda medular não é um sinal específico da leptospirose em cães e corresponde à região de edema renal, necrose e hemorragia. Ao exame radiológico pode-se observar padrão alveolar nodular associado à hemorragia pulmonar oriunda de lesão endotelial e vasculite. Outras formas de diagnóstico do agente são representadas pela cultura bacteriana, ELISA, visualização do micro-organismo por exame do campo escuro e achados de necropsia (ENRIETTI, 2001; PICARDEAU et al., 2014).

Os métodos de diagnóstico diretos específicos identificam a presença do agente etiológico e os métodos indiretos detectam anticorpos específicos contra leptospiros. Normalmente os métodos indiretos são mais utilizados, por serem mais rápidos e de menor custo, porém, atualmente as técnicas moleculares têm sido mais recomendadas por serem altamente sensíveis e específicas (GREENE et al., 2012).

O isolamento da bactéria é considerado o padrão ouro de diagnóstico, apesar disso, o método é dificultado pela necessidade de imediata inoculação pós-coleta em meios de cultura específicos e pelo demorado índice de crescimento do micro-organismo (LEVETT, 2004; ADLER, DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010).

2.7.2 Soroaglutinação microscópica

O método padrão ouro indicado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para o diagnóstico da leptospirose em humanos e animais é a Soroaglutinação Microscópica com antígenos vivos (SAM). Esse método consiste em adicionar ao soro teste uma suspensão de leptospiros vivas mantidas em meio de cultura. Se houver anticorpos anti-*Leptospira* spp. no soro testado, as bactérias se aglutinarão, formando complexos que podem ser observados em microscópio de campo escuro (WHO, 2003).

A SAM detecta anticorpos das classes IgM e IgG, e não pode diferenciar entre infecção atual, recente ou antiga, ou até mesmo diferenciar anticorpos

consequentes de infecção natural ou em resposta à vacinação. Desta forma, é importante considerar o histórico de imunização dos pacientes submetidos ao teste. Depois de 45 a 60 dias da vacinação, os títulos de anticorpos contra diversos sorovares encontrados na vacina podem persistir em um título de 100 ou mais (OIE, 2012).

Para o diagnóstico sorológico é necessário que o animal apresente anticorpos anti-*Leptospira* que geralmente ocorrem em uma fase mais tardia, após a fase aguda da doença ou na fase de convalescência (PICARDEAU et al., 2014). Cães naturalmente infectados possuem títulos de 800U ou mais, para um sorovar que é epidemiologicamente importante para a espécie. O teste pode ser falso negativo quando o sorogrupo envolvido na doença não está incluso nos sorovares testes, ou quando o micro-organismo possui pouca afinidade com os micro-organismos escolhidos para representar os sorogrupos. Em alguns casos, animais saudáveis podem apresentar títulos devido à exposição ao micro-organismo. Aumentos inespecíficos de títulos podem decorrer de reações cruzadas quando o animal foi previamente vacinado, gerando resultados falso positivo (MODOLO et al., 2006; DAHER; ABREU; SILVA JUNIOR, 2010; GREENE et al., 2012; PICARDEAU, 2013).

Cães com títulos muito elevados (de 1.600 a 12.800) no primeiro exame, geralmente mantém altos títulos mesmo após início da antibioticoterapia e o declínio desses títulos demoram até quatro meses. Este tipo de resultado demonstra uma infecção crônica e com persistente replicação do micro-organismo. No entanto, é importante salientar que os níveis de títulos de anticorpos não possuem relação com a gravidade dos sinais clínicos apresentados pelo paciente (GREENE et al., 2012; PAES, 2016).

Diversos fatores podem influenciar na titulação da SAM. É possível que a terapia antimicrobiana precoce reduza a titulação. Baixos títulos (< 400), podem indicar exposição a outra espiroqueta que não seja *Leptospira* spp. (GOLDSTEIN, 2010).

2.7.3 Identificação do micro-organismo

Recentemente, as leptospiros têm sido identificadas por métodos moleculares como a PCR. Esta técnica permite diferenciar rapidamente leptospiros patogênicas das não patogênicas, e os sorovares especificamente (KOIZUMI, et al., 2013).

Sangue, plasma ou urina são as amostras preferenciais para a realização da PCR, assim como fragmentos de órgãos de eleição como fígado e rins. O uso de antimicrobianos pode estar relacionado à negatividade de exames de PCR. Devido à incerteza do início da infecção recomenda-se testar amostras de sangue e urina concomitantemente (GREENE et al., 2012; KOIZUMI, et al., 2013). Assim como os testes sorológicos, a PCR pode gerar resultados falso positivos ao detectar sorovares não patogênicos e micro-organismos eliminados por animais portadores assintomáticos. Recomenda-se associar os resultados dos testes laboratoriais aos achados clínicos e hematológicos (PAES, 2016).

Por outro lado a PCR permite detectar as leptospiros antes mesmo de ocorrer a soroconversão, viabilizando o diagnóstico precoce (MAELE et al., 2008).

Outra vantagem do diagnóstico molecular é que a PCR identifica leptospiros em animais portadores assintomáticos, que estão eliminando o micro-organismo pela urina, contaminando o ambiente e predispondo a infecção de outros animais e humanos (ZAKERI et al., 2010; KOIZUMI et al., 2013).

A técnica da PCR se divide em duas categorias baseadas na detecção de genes que estão universalmente presentes na bactéria, como o gene 16S rRNA, o gene gyrB e o gene secY, ou na detecção de genes restritos às bactérias patogênicas, como o gene lipL32, o ligA e o ligB, sendo os últimos mais efetivos em diagnósticos precoces da doença (RICHTZENHAIN et al., 2002; PICARDEAU, 2013).

Resultados falsos negativos podem ocorrer quando há reduzida quantidade de micro-organismos na amostra testada e redução de micro-organismos por situações que os inibem como o pH ácido da urina, baixa

sensibilidade de alguns testes e ineficiência no procedimento de extração do ácido nucléico (PICARDEAU, 2013).

2.8 Terapêutica

O tratamento específico para a leptospira é o uso da antibioticoterapia. A estreptomicina foi um dos primeiros medicamentos a ser utilizado, porém atualmente existem mais opções para serem utilizadas em casos de animais com leptospirose, de acordo com o quadro clínico do animal (GREENE et al., 2012).

Penicilina e seus derivados são antibióticos de escolha para o tratamento da leptospiremia em cães, pois tem ótima difusão pulmonar, entérica, hepática e também no parênquima renal, porém não penetram nas células tubulares renais, local de predileção das leptospiros para se multiplicarem. Neste caso, os animais se tornam portadores renais e apresentam leptospirúria prolongada (GUERRA, 2009; PAES, 2016).

Para eliminar o estado de portador, doxiciclina, estreptomicina e derivados podem ser utilizados, após o restabelecimento da função renal. A doxiciclina é indicada para a eliminação de leptospiros dos túbulos renais, porém estudos *in vivo* demonstraram o uso da estreptomicina sendo mais efetivo, podendo anular o estado de portador com apenas uma dose (PAES, 2016).

Inicialmente é instituída terapia de suporte de acordo com a gravidade da doença e o nível de acometimento renal e hepático. A desidratação e o choque ocorrem em animais severamente acometidos. A colocação de sonda uretral é importante para mensurar o débito urinário em pacientes oligúricos. As perdas decorridas de êmese e diarreia devem ser contabilizadas para reposição por fluidoterapia intravenosa. Deve-se descontinuar a alimentação por via oral em animais que apresentem vômitos. Nestes casos, deve-se iniciar terapia anti-emética associada ao uso de protetores gástricos (MAELE et al., 2008; GREENE et al., 2012; PAES, 2016).

Cães oligúricos (débito urinário < 2,0 mL/kg/h) ou anúricos devem ser tratados inicialmente com rehidratação. Diuréticos osmóticos como glicose de 10% a 20% (5mL/kg) ou manitol a 20% (0,5 g/kg), podem ser utilizados por via

intravenosa de 30 a 60 minutos quando a função renal não retorna após rehidratação. Se o tratamento com estes diuréticos não surtirem efeito, administrar 2,5 a 5 µg/kg/minuto de dopamina ou agentes dopaminérgicos por infusão intravenosa. Diuréticos de ação tubular como a furosemida (2 a 4 mg/kg) podem ser administrados associados a dopamina para aumentar o fluxo renal. Terapias emergenciais como diálise peritoneal, ou preferencialmente hemodiálise, ou terapias de substituição contínuas devem ser consideradas quando a oligúria persiste e a azotemia for grave, sendo a IRA reversível (PAES, 2016).

A antibioticoterapia reduz a febre e leptospiremia em poucas horas. Imediatamente ocorre a inibição da multiplicação, reduzindo rapidamente as complicações da infecção como injúria renal e hepática. A terapia antimicrobiana deve ser instituída imediatamente após a suspeita da doença (MAELE et al., 2008; GREENE et al., 2012; PAES, 2016).

Testes experimentais “*in vivo*” demonstraram sensibilidade das leptospiras às penicilinas, cefalosporinas, aminoglicosídeos, tetraciclina e macrolídeos (azitromicina, claritromicina e eritromicina). O uso da penicilina e derivados é de escolha para interromper a leptospiremia, mas são incapazes de eliminar as leptospiras dos rins em estudos com cães e hamsters. A penicilina ou ampicilina podem ser administradas por via parenteral nos primeiros 14 dias para combater a leptospiremia. Aminoglicosídeos não devem ser administrados em cães portadores renais sem realizar novo exame de função renal, estando com todos os níveis dentro dos valores de referência. Cefalosporinas de terceira geração como ceftiofur conseguem eliminar as bactérias dos túbulos renais de cães. A ceftriaxona também foi eficaz em combater a leptospirose em humanos (MAELE et al., 2008; GREENE et al., 2012; PAES, 2016).

Os pacientes recuperados devem ser monitorados pelo menos de seis a doze meses após o fim da terapia, por causa do desenvolvimento de complicações associadas à doença renal crônica (GREENE et al., 2012).

2.9 Imunização

A imunização é sorovar-específica e protege apenas contra a doença causada pelo sorovar homólogo ou sorovares similares antigenicamente. Portanto, as vacinas precisam conter sorovares representativos daqueles presentes na população que será imunizada (LEVETT, 2001).

As vacinas caninas geralmente contêm antígenos que imunizam contra os sorovares *Icterohaemorrhagiae* e *Canicola*, mas cães imunizados podem ser infectados com sorovares que não estejam contidos nas vacinas comerciais (GREENE et al., 2006). Visto a ocorrência cada vez maior de outros sorovares em cães, isto reforça ainda mais a importância da pesquisa continuada no desenvolvimento de novas vacinas contra leptospirose e a necessidade da inclusão de novos sorovares, visando à elaboração de vacinas mais efetivas e com imunidade mais duradoura (BATISTA et al., 2004).

É importante salientar que as vacinas contra leptospirose são todas inativadas, contendo bacterinas ou frações purificadas dos antígenos de membrana (RODRIGUES et al., 2013). Essas vacinas têm como vantagens a incapacidade de replicação da bactéria dentro do hospedeiro e serem bem toleradas. Porém, elas induzem respostas sorológicas baixas e pouco duradouras, em torno de seis a doze meses, sendo necessária a revacinação duas vezes por ano, para a manutenção da imunidade (BHARTI, NALLY, 2003; KOIZUMI e WATANABE, 2005).

Todos os cães sob risco de infecção devem ser vacinados com duas doses iniciais de vacina bivalente, a partir de pelo menos nove semanas de idade e depois revacinados anualmente (RODRIGUES et al., 2013; MARTIN et al., 2014). Após a vacinação, os cães podem desenvolver anticorpos homólogos em títulos > 800, dificultando a interpretação dos resultados da SAM. Porém, um ano após a vacinação, os cães não apresentam títulos de anticorpos detectáveis pela reação de SAM (MARTIN et al., 2014).

2.10 Reflexos em Saúde Pública

O Brasil é o segundo maior país do mundo em número de cães, com uma população estimada em torno de 32 milhões de animais. Estudos sorológicos realizados na população canina brasileira têm demonstrado o caráter endêmico da leptospirose nesses animais (CASTRO et al., 2011; FONZAR, LANGONI, 2012; LAVINSKY et al., 2012). Segundo esses autores, as taxas sorológicas variam de 13 a 35% de soropositividade, sendo os sorovares mais prevalentes: *Icterohaemorrhagiae*, *Canicola*, *Copenhageni*, *Grippotyphosa* e *Autumnalis*. Apesar de estes resultados apontarem o caráter endêmico da leptospirose canina no Brasil, não existem estimativas quanto ao número de cães infectados. Este fato tem gerado discussões a respeito da efetividade, da eliminação do status de portador renal crônico e duração da cobertura das vacinas existentes contra a leptospirose nestes animais (MINKE et al., 2009).

Em humanos, os casos de leptospirose têm aumentado no mundo todo. Estima-se que ocorra 1 caso a cada 100.000 habitantes/ano em áreas geográficas com clima temperado, mais de 10 casos a cada 100.000 habitantes/ano em áreas subtropicais, e mais de 100 casos a cada 100.000 habitantes/ano em áreas endêmicas e de surtos (HARTSKEER; COLLARES-PEREIRA; ELLIS, 2011).

Humanos podem contrair a leptospirose por atividades recreativas e ocupacionais. *Leptospira* sp. sobrevive em ambientes úmidos e cães infectados, assim como outros animais, disseminam o micro-organismo pela urina, podendo contaminar águas utilizadas para ingestão, banho ou em águas de lazer para os humanos. Elevados índices pluviométricos também são responsáveis pelo aumento da umidade ambiental como em solo inundado, impedindo a evaporação da urina contaminada, mantendo as leptospiros eliminadas viáveis no ambiente. O grupo com maior risco de contrair a infecção são aqueles que possuem atividade ocupacional, expondo-se à animais de vida livre ou domésticos infectados, ou realizam atividades de esporte e lazer ligados à água. Estes indivíduos são contaminados pelo contato com urina dos animais infectados ou tem contato com fômites diariamente. Estudantes e profissionais de medicina veterinária podem se infectar durante

treinamento clínico, em inspeção de alimentos, ou em trabalho em fazendas (MARTINS; LILENBAUM, 2013).

O envolvimento de cães na transmissão da doença aos humanos deve ser considerado, uma vez que a urina contaminada é altamente contagiosa para os humanos. Portanto, o contato com urina de animais suspeitos deve ser evitado. As leptospiros não possuem a capacidade de penetrar a pele íntegra, no entanto, pele com ferimentos abertos, hiper-hidratação devido à permanência prolongada na água, exposição de mucosas ou ingestão de água aumentam o risco de infecção. O animal suspeito deve ser separado dos demais animais e humanos, e mantido isolado. Luvas de látex devem ser utilizadas pelos humanos ao manipular urina ou objetos contaminados pela urina do animal. Cães submetidos à antibioticoterapia que não tenham capacidade de eliminar leptospiros dos túbulos renais, podem permanecer eliminando leptospiros pela urina. Áreas contaminadas pela urina de animais doentes devem ser lavadas com detergente e posteriormente com desinfetantes. Humanos com imunodeficiência representam alto grupo de risco (JOUGLARD; BROD, 2000; GREENE et al., 2012; MARTINS; LILENBAUM, 2013).

Os cães têm sido considerados um fator de risco para infecção de seus donos por leptospiros. Um estudo na Califórnia, EUA, registrou 61 casos de leptospirose em humanos durante os anos de 1982 a 2001, verificando-se que 10% dos casos estavam relacionados a proprietários com cães portadores de leptospiros (MEITES et al., 2004). Cães domésticos são importantes reservatórios de infecções para humanos porque eles eliminam a bactéria viva na urina durante meses sem sinais clínicos (BATISTA et al., 2004).

Jouglard e Brod (2000) investigaram a prevalência de cães com leptospirose em região rural do município de Pelotas, encontrando maior prevalência dos sorovares *Icterohaemorrhagiae* (30,77 %) e *Copenhageni*, seguidos pelos sorovares *Australis* e *Canicola* (23,08%). Hamilton Rice (1926 *apud* Enrietti, 2001) realizou estudos experimentais na região do Amazonas, onde demonstrou a viabilidade da infecção em cães, assim como a possível disseminação da doença para outros animais e aos humanos.

Querino et al. (2003), testaram 160 cães de Londrina, PR, para leptospirose com a técnica de SAM e identificaram que 40% dos cães foram sororeagentes

para o sorovar Icterohaemorrhagiae. Porém 45% foram reagentes para o sorovar Pyrogenes, que é um dos sorovares mais patogênicos para os humanos, ressaltando assim a importância do cão na epidemiologia da leptospirose humana.

Tesserolli et al. (2005) realizaram o perfil sorológico de 399 cães de Curitiba, PR, onde 114 foram reagentes para *Leptospira* spp. O sorovar Copenhageni (86,84%) foi o mais prevalente demonstrando a importância dos roedores na epidemiologia da doença, enquanto o segundo sorovar mais reagente foi o Canicola (9,65%), indicando que o cão é também importante fonte de infecção para os humanos.

Silva et al., em 2009, avaliaram 1.000 cães da cidade de Botucatu, SP, realizando o perfil sorológico, onde 179 animais foram reagentes com titulação $\geq$ a 100. O trabalho foi realizado com cães participantes da campanha antirrábica, onde o posto de Vila São Luís apresentou a maior prevalência da doença (44,2 %) e o da COHAB – V a menor (6,0%). Observaram-se também reações para 20 sorovares, sendo os mais frequentes: Castellonis (28,68 %), Autumnalis (19,12%), Pyrogenes (17,65 %), Icterohaemorrhagiae (11,03 %) e Canicola (9,56%).

2.11 Prevenção

A prevenção da leptospirose está ligada à eliminação da leptospira em portadores renais. Animais de vida livre e animais selvagens são reservatórios assintomáticos e, por sua vez, podem transmitir o patógeno para animais domésticos (PAES, 2016).

Para prevenção da doença deve-se controlar a presença de roedores em canis e residências, manter condições ambientais desfavoráveis à sobrevivência das leptospiros, isolar animais infectados e vacinar profilaticamente (FONZAR; LANGONI, 2012; GREENE et al., 2012).

Para o controle de roedores, evitar o acúmulo e dar destino correto do lixo, pois fornece alimento e abrigo para estes animais; utilização de ratoeiras e rodenticidas caso haja infestação de roedores; armazenar adequadamente alimentos e ração. Drenagem e canalização de esgotos, tratamento e

canalização de cursos d'água são medidas gerais de saneamento que também ajudam o controle de roedores (WHO, 2003; PAES, 2016).

Os cães portadores renais de leptospira devem ser tratados com antimicrobianos, pois podem apresentar leptospirose por longos períodos, atuando como fonte de infecção para outros animais e para os seres humanos (ROJAS et al., 2010; PAES, 2016).

A imunização em cães é uma medida profilática específica reduzindo a ocorrência da doença e a gravidade de sinais clínicos. Os principais sorovares incluídos nas vacinas são Canicola, Icterohaemorrhagiae, Pomona e Grippotyphosa (PAES, 2016). Os sorovares Canicola e Icterohaemorrhagiae, que eram mais frequentes no cão, parecem estar diminuindo a ocorrência, dando lugar aos sorovares Grippotyphosa, Pomona e Bratislava (BROWN et al., 1996). Em um estudo, Schreiber et al. (2005) concluíram que cães vacinados contra leptospirose apresentam completa proteção contra leptospirose e leptospirose, não se tornando portadores renais, prevenindo cães de adquirirem a doença tanto de forma aguda como crônica. O protocolo de vacinação adequado tem início em filhotes com nove semanas. São realizadas três aplicações com intervalo de 21 a 30 dias, e reforço anual (GREENE et al., 2012). Klaasen et al. (2003) demonstraram que a imunidade de um cão vacinado corretamente pode durar por um ano (13 meses aproximadamente) com vacina inativada bivalente (Canicola e Icterohaemorrhagiae).

Em áreas de alta incidência da doença, locais expostos a inundações, alagadiços, ambientes com excesso de cães errantes e com falta de infraestrutura básica, é recomendado a vacinação dos animais a cada seis meses, utilizando apenas a vacina composta pelos sorovares da leptospira (PAES, 2016).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Identificar e avaliar a soroprevalência de anticorpos anti-leptospira em cães, bem como a pesquisa molecular por PCR dos cães domiciliados, atendidos no HV da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP e Canil Municipal de Botucatu.

3.2 Objetivos Específicos

I - Realizar inquérito epidemiológico com os proprietários dos animais visando estabelecer uma relação entre os sorovares e achados epidemiológicos;

II - Investigar os sorovares de *Leptospiras* spp. prevalentes em cães assintomáticos e avaliar sua importância e potencial zoonótico, utilizando a técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM);

III - Detectar *Leptospira* spp. a partir de amostras de urina de cães pela técnica de PCR convencional;

IV - Avaliar o perfil enzimático renal e hepático dos cães;

V - Avaliar os fatores de risco e as áreas de procedência, associando a soroprevalência dos cães na região de Botucatu, SP.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cálculo do tamanho amostral

O software Epi Info 3.5.1 (CDC, 2008) foi utilizado para determinar o número mínimo de amostras ($N=150$), adotando 10% de prevalência esperada, nível de confiança de 95% e margem de erro de 5%. A população total de cães do município de Botucatu foi calculada baseada no levantamento pela disciplina de “Planejamento de Saúde Animal e Veterinária Preventiva e Prática de Fazendas” da FMVZ – Unesp Campus de Botucatu, com base nas campanhas anuais de vacinação contra a raiva de cães e gatos do município, totalizando aproximadamente 27.000 cães no ano de 2014. Para tanto, foram utilizados 318 cães atendidos na rotina do HV da UNESP/Botucatu/SP, Canil Municipal da cidade de Botucatu/SP e cães domiciliados. Foram selecionados animais independentes de raça, sexo ou idade.

4.2 Animais

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de Ética em Experimentação Animal da FMVZ/UNESP/ Botucatu, SP, protocolo CEUA número 29/2016 (Anexo 3).

Os animais utilizados no estudo não apresentavam sinais clínicos compatíveis com a doença clínica, tais como: icterícia e urina cor de coca-cola e que não receberam imunização contra leptospirose nos últimos quatro meses.

Os animais do estudo foram submetidos à avaliação física visando detectar qualquer sinal compatível com a leptospirose. Para coleta das amostras e inclusão no estudo, os proprietários dos animais preencheram e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2).

4.3 Coleta de material biológico

Amostras de sangue foram colhidas para sorologia (SAM) e urina para realização da PCR, que foram processadas no Laboratório de Diagnóstico de

Zoonoses e Serviço de Biologia Molecular Aplicado à Zoonoses do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da FMVZ – UNESP, Botucatu.

Foram coletados 5,0 mL de sangue por punção venosa jugular ou cefálica, com o auxílio de seringa descartável de 5,0 mL e agulha 30 x 8 mm. O sangue foi transferido para tubo seco e centrifugado a 3.000g por 10 minutos para obtenção do soro, que foi armazenado em microtubo de 1,5 mL em freezer a – 20°C até seu processamento. A urina foi coletada por cistocentese (fêmeas) e por cateterismo (machos), e acondicionada em microtubos plásticos *eppendorfs*® RNase e DNase free com solução de PBS pH 7,6 diluído na proporção 1:1 com a urina para tamponá-la e em seguida mantida em freezer – 20°C até o seu processamento.

4.4 Exames diagnósticos

4.4.1 Soroaglutinação Microscópica (SAM)

A prova de Soroaglutinação Microscópica (SAM) foi realizada no Laboratório de Diagnóstico de Zoonoses da FMVZ – UNESP, Botucatu – SP, seguindo as normas do Ministério da Saúde (BRASIL, 1995). Foram utilizados como antígenos, culturas vivas de *Leptospira* spp. mantidas em estufa de 28°C a 30°C.

O soro dos animais foi testado na SAM frente a 25 sorovares (Quadro 1). Como antígeno foram utilizadas culturas de cepas-padrão de leptospiros, mantidas em repiques semanais em meio de Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) (DIFCO Laboratories®). Para a prova de triagem, o soro foi diluído pipetando-se 0,1 mL deste em 4,9 mL de Solução Salina Tamponada (SST) 0,01 M pH 7,6 em tubo de ensaio pequeno, correspondendo a diluição 1:50. Em microplaca, identificada e marcada (pipetou-se 50µL do soro diluído nos poços, formando uma fileira). O número de poços preenchidos foi dependente do número de soros que foram testados. O mesmo procedimento foi repetido para o controle, que ao invés de soro foi pipetado SST 0,01M pH 7,6. Em seguida, acrescentou-se aos poços, inclusive no controle, 50 µL das correspondentes suspensões antigênicas, passando a

diluição final em cada poço para 1:100. Agitou-se levemente a microplaca, e incubou-se a 37°C, por uma hora. Com o auxílio de uma alça bacteriológica de 2 mm de diâmetro, foi disposta uma gota do conteúdo de cada poço em fileiras sobre uma lâmina, sem lamínula que foi posteriormente observado em microscópio de campo escuro.

O grau de aglutinação foi avaliado para cada sorovar, considerando-se positivos aqueles que apresentaram 50% ou mais de aglutinação, ou seja, no mínimo 50% de leptospiras aglutinadas, e 50% livres, tendo como referência os respectivos controles. A titulação foi realizada de acordo com o soro que na prova de triagem, apresentou 50% de aglutinação, realizada somente para os sorovares reagentes na prova de triagem. A partir da titulação 1:50 nesta prova, preparou-se mais seis diluições do soro ou quantas fossem necessárias, consecutivas e na razão 2 (títulos de 100 a 3200). Preparou-se uma microplaca com fileiras contendo seis poços, que corresponderam à titulação de um determinado sorovar. À parte, preparou-se também um poço controle para cada antígeno utilizado. Colocou-se, 100 µL de soro diluído a 1:50 no primeiro poço, colocando 50 microlitros de SST 0,01M pH 7,6 nos demais poços do respectivo antígeno. Dessa mesma forma foi realizado para os demais soros testados. Para obter a diluição desejada, pipetou-se 50 microlitros da primeira diluição para o próximo poço, e assim sucessivamente. Ao final, todos os poços apresentaram 50 microlitros de suspensão (diluyente + soro), correspondente às diluições 1: 50, 1:100, 1:200, e assim sucessivamente em cada fileira, equivalendo-se aos títulos 50, 100, 200, e assim por diante. Pipetou-se 50 microlitros do antígeno (sorovar) correspondente a cada poço da fileira controle, incubou-se e foi realizada a leitura conforme descrito na prova de triagem (BRASIL, 1995). O ponto de corte para reação positiva de aglutinação foi definido como título maior ou igual a 100 (WHO, 2003). Considerou-se como título a maior diluição do soro capaz de aglutinar 50% ou mais das leptospiras, em relação ao controle (BRASIL, 1995).

Quadro 1. Bateria de sorovares de *Leptospira* spp. mantidos na rotina diagnóstica do Laboratório de Serviço de Diagnóstico de Zoonoses da FMVZ- UNESP/ Botucatu – SP.

ESPÉCIE	SOROGRUPO	SOROVAR	CEPA
<i>L. interrogans</i>	Australis	Australis	Ballico
<i>L. interrogans</i>	Australis	Bratislava	Jez-Bratislava
<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A
<i>L. kirschneri</i>	Autumnalis	Butembo	Butembo
<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Castellonis	Castellón
<i>L. interrogans</i>	Bataviae	Bataviae	Van Tienen
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV
<i>L. weilli</i>	Celledoni	Whitcombi	Whitcombi
<i>L. kirschneri</i>	Cynopteri	Cynopteri	3552 C
<i>L. interrogans</i>	Djasiman	Djasiman	Djasiman
<i>L. interrogans</i>	Djasiman	Sentot	Sentot
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moska V
<i>L. interrogans</i>	Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	M 20
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA
<i>L. borgpetersenii</i>	Javanica	Javanica	Veldrat Batavia 46/RA 94
<i>L. noguchi</i>	Panama	Panama	CZ 214 K
<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona	Pomona
<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Hardjo	Hardjoprajitno
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Wolffi	3705
<i>L. santarosai</i>	Shermani	Shermani	LT 821
<i>L. borgpetersenii</i>	Shermani	Tarassovi	Perepelitsin
<i>L. biflexa</i>	Andamana	Andamana	CH 11
<i>L. biflexa</i>	Semaranga	Patoc	Patoc 1
<i>L. santarosai</i>	Sejroe	Guaricura	Bov G.
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Hardjobovis	Hardjobovis
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	HardjoCTG	HardjoCTG
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Mini	Hardjominis
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	HardjoPrajitno	Hardjoprajitno
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Nupezoz	NUP-1

4.4.2 Análises bioquímicas

O soro dos animais incluídos no estudo foram testados para perfil renal e hepático, sendo realizadas as seguintes análises: ureia, creatinina, alanina aminotransferase (ALT), gama glutamiltranspeptidase (GGT), fosfatase alcalina (FA), bilirrubinas, creatinina quinase (CK), e eletrólitos (sódio e potássio).

4.4.3 Diagnóstico molecular

4.4.3.1 Preparo das amostras para extração do DNA

As amostras de urina foram processadas no Laboratório de Biologia Molecular do Serviço de Diagnóstico de Zoonoses da FMVZ – UNESP, Botucatu – SP. Cada amostra foi lavada em solução salina tamponada (SST) estéril, pH 7,6, previamente ao congelamento, com o objetivo de remover proteínas e íons que pudessem interferir na reação de PCR. Para tanto, cada amostra de urina foi centrifugada a 11.000 g, o sobrenadante descartado, e o pellet lavado em SST utilizando-se um agitador automático do tipo vórtex (IKA®) por aproximadamente 10 segundos. O procedimento foi repetido mais uma vez e o pellet ressuspendido em uma solução final de 1 mL de SST, obtendo-se assim uma alta concentração celular na urina, a qual foi armazenada a - 80°C para prosseguir com a extração.

4.4.3.2 Extração do DNA

O DNA genômico foi extraído usando o “kit” de extração comercial de DNA, Illustra Blood Prep Mini Spin kit (GE Healthcare®, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), de acordo com as instruções do fabricante.

As amostras foram transferidas, no volume de 200 µL, para um microtubo estéril de 1,5mL (AXYGEN®), livre de DNase e RNase. Em seguida, foi adicionado 20µL de proteinase K, homogeneizando em agitador automático do tipo vórtex (IKA®) por 10 segundos, e acrescentando-se 400 µL de tampão de lise, incubando por 10 min em temperatura ambiente sob agitação constante

em agitador automático (IKA®). As amostras foram submetidas a vórtex por 10 segundos, e o conteúdo transferido para uma coluna e seu respectivo tubo coletor. Os tubos foram centrifugados a 11.000 g por 1 min, acrescentando-se 500 µL de solução de tampão de lise e novamente centrifugados a 11.000 g por 1 min. Em seguida adicionou-se 500 µL de tampão de lavagem, centrifugando-se a 11.000g por 3 minutos. Os tubos coletores foram descartados a coluna acoplada em novo microtubo de 1,5 mL, previamente descritos. Foi acrescentado 200 µL da solução de eluição a 70°C, incubando-se por 1 minuto a temperatura ambiente, em seguida os microtubos foram centrifugados a 11.000 g por 1 minuto. A amostra obtida foi armazenada em geladeira a 4°C por 24 horas, para a estabilização do DNA, e em seguida estocada em freezer a -20°C para posterior análise. Foi utilizado como controle negativo água ultrapura livre de nuclease, e para controle positivo foi utilizado uma amostra previamente extraída a partir de uma alíquota do cultivo de cepa-padrão mantida semanalmente em repique no Laboratório de Serviço de Diagnóstico de Zoonoses, FMVZ – UNESP, Botucatu.

4.4.3.3 PCR e Eletroforese

A amplificação do DNA foi realizada em microtubos (0,2 mL) estéreis e livres de RNase e DNase (Axygen®, Union City, California, USA), usando *primers* específicos para o gênero *Leptospira* descritos por Mérien et al. (1992), correspondendo aos nucleotídeos 38 a 57 (LEP-1, 5'-GGCGGC-GCGTCTTAAACATG-3') e 348 a 369 (LEP-2, 5'-TTCCCCCATTG-AGCAAGATT-3'), da estrutura primária do gene 16S rRNA da *Leptospira interrogans* sorovar Canicola.

A amplificação do DNA foi realizada segundo Merien et al. (1992), com algumas modificações. Cada tubo de reação de 0,2 mL recebeu-se 2,5 µL de tampão de PCR (50 mM KCl, 10 mMTris-HCl pH 8,0), 0,5 µL de MgCl₂ (1,5 mM), 0,5 µL de Taq platinum polimerase (5U/µL) (Invitrogen®), 0,5 µL de solução de dNTP (200µM) (Invitrogen®), 1,0 µL de cada oligonucleotídeo (10 pmol) (IDT), 16,0 µL de água ultra pura (Gibco®) e 3 µL de DNA obtido na extração. Os controles positivos e negativos utilizados foram os mesmos

descritos na etapa de extração de DNA. A amplificação foi realizada em termociclador Mastercycler ep (Eppendorf®), com ciclo consistindo de uma desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguido por 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, anelamento a 63°C por 1,5 minutos, e uma extensão final a 72°C por 2 minutos para completar a extensão dos *amplicons*.

Para a visualização dos produtos obtidos, os mesmos foram submetidos à eletroforese horizontal. Uma alíquota de 10 µL de cada produto amplificado foi pipetado e colocado em um poço do gel de agarose 2,0% adicionando-se 2 µL de Nancy – 520 – DNA Gel Stain™ (Sigma-Aldrich®) ao gel. Após homogeneização, esta solução foi submetida à eletroforese em solução tampão TBE 1x (0,09 M Tris-HCl, 0,09 M de ácido bórico, 2 mM EDTA, pH 8,3), com corrida a 90 volts por aproximadamente 60 minutos (Electrophoresis Power Supply Model EPS 301, GE Healthcare®). Para a visualização das bandas foi realizada sob luz ultravioleta (296 nm) em transiluminador, e em seguida fotografadas e registradas utilizando o sistema de fotodocumentação GelDOC®it, UVP, GelDoc-IT™ (Imaging System), e o programa Vision Works® LS Software. A definição de resultados positivos foi baseada na presença de bandas no gel de agarose, tomando-se como referência o controle positivo.

4.5 Questionário epidemiológico

Referente a cada animal foi aplicado um questionário de inquérito epidemiológico para o estudo dos fatores de risco associados à infecção por *Leptospira* spp. As questões foram formuladas para verificar as várias possibilidades de exposição dos animais em relação ao agente.

O questionário foi elaborado a partir da epidemiologia da leptospirose considerando-se a situação dos animais mantidos domiciliados e com acesso à rua, vacinação, as diferentes espécies com as quais eles convivem (como por exemplo: outros cães, gatos, bovinos, equinos, pássaros, silvestres), os diferentes bairros do município, áreas de enchente, assim como a presença de roedores e a disponibilidade do alimento na residência do proprietário (Anexo 1).

4.6 Análise Estatística

A prevalência de animais portadores assintomáticos e respectivo intervalo de confiança de 95% foi estimada na população estudada de 318 cães. Foi avaliada a distribuição de frequências dos diversos sorovares encontrados entre os animais sororeagentes.

Em seguida, foi avaliada a associação entre a sorologia para leptospirose e os fatores de risco obtidos por meio do questionário e exame bioquímico (PROC FREQ, SAS Institute, 2011). Os fatores que apresentaram valor $P < 0,25$ foram submetidos à análise multivariada final. Modelos de regressão logística foram construídos para estimar as chances de sororeatividade à leptospirose como função dos fatores de risco obtidos com o questionário e exame bioquímico (PROC GLIMMIX, SAS Institute, 2011). Termos de interação e fatores de confusão entre os fatores de risco foram incluídos no modelo e, permaneceram no mesmo, caso significantes.

5. RESULTADOS

Observou-se uma soroprevalência de 42,7% (136/318) de animais reagentes pela técnica da SAM, com soropositivos para diferentes sorovares e títulos variáveis, de acordo com a tabela 1.

Como algumas amostras foram reagentes a mais de um sorovar, o total de amostras reagentes foi de 329, sendo este o número utilizado como equivalente a 100% para o cálculo da frequência da ocorrência de cada sorovar e cada titulação.

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.

S	100	200	400	600	800	1600	R	N
11A	2	19	25	0	6	0	52/329	52/136
	0,6%	5,7%	7,6%	-	1,8%	-	15,8 %	38%
	3,8%	36,5%	48,0%	-	11,5%	-		
11B	3	14	21	0	4	0	42/329	42/136
	0,9%	4,2%	6,3%	-	1,2%	-	12,7%	30%
	7,1%	33,3%	50,0%	-	9,5%	-		
14A	0	4	0	0	0	0	4/329	4/136
	-	1,2%	-	-	0,0%	-	1,2%	0,03%
	-	100%	-	-	0,0%	-		
15	1	5	0	1	2	0	9/329	9/136
	0,3%	1,5%	-	0,3%	0,6%	-	2,7%	0,06%
	11,1%	55,5%	-	11,1%	22,2%	-		
16A	2	0	1	0	0	0	3/329	3/136
	0,6%	0,0%	0,3%	-	-	-	0,9%	0,02%
	66,6%	0,0%	33,3%	-	-	-		
1A	1	8	0	0	0	0	9/329	9/136
	0,3%	2,4%	-	-	-	-	2,7%	0,06%
	11,1%	88,8%	-	-	-	-		
1B	0	5	0	0	0	0	5/329	5/136
	-	1,5%	-	-	-	-	1,5%	0,03%
	-	100%	-	-	-	-		
5	2	10	26	0	1	0	39/329	39/136
	0,6%	3,0%	7,9%	-	0,3%	-	11,8%	28%
	5,1%	25,6%	66,6%	-	2,5%	-		
7	6	20	20	0	3	0	39/329	39/136
	1,8%	3,0%	6,0%	-	0,9%	-	11,8%	28%
	15,3%	25,6%	51,2%	-	7,6%	-		
8A	2	0	0	0	0	0	2/329	2/136
	0,6%	0,0%	0,0%	-	-	-	0,6%	0,01%
	100%	0,0%	0,0%	-	-	-		
9	1	14	32	0	10	0	57/329	57/136
	0,3%	4,2%	9,7%	-	3,0%	-	17,3%	42%
	1,7%	24,5%	56,1%	-	17,5%	-		
NUP	6	18	36	0	6	2	68/329	68/136
	1,82	5,47%	10,94%	-	1,82%	0,61%	20,67%	50%
	8,82	26,47%	52,94%	-	8,82%	2,94%		
T	26	107	161	1	32	2	329	136
	7,9%	32,5%	48,9%	0,3%	9,7%	0,6%	100%	100%

Legenda: S: sorovares, R: nº de observações de amostras reagentes 329 (%); N: total amostras sororeagentes 136 (%); T: total; 11A-Copenhageni, 11B-Icterohaemorrhiae, 14A-Pomona, 15-Pyrogenes, 16A-Hardjo, 1A-Australis, 1B-Bratislava, 5-Canicola, 7-Cynopteri, 8A-Djasiman, 9-Gryppotyphosa, NUP-NUPEZO.

O sorovar prevalente foi o NUPEZO com 68 (50%) amostras positivas, seguido dos sorovares Gryppotyphosa com 57 (42%), Copenhageni com 52 (38%), Icterohaemorrhagiae com 42 (30%), Canicola com 39 (28%) e Cynopteri com 39 (28%). É importante ressaltar que os animais sororeagentes todos os sorovares testados pertencentes a bateria utilizados nos casos de carnívoros, totalizando 12 sorovares, revelando algum título.

Entre os sorovares mais prevalentes foi possível observar altos títulos, de até 1:800 e o sorovar NUP-1 apresentou título de 1:1600. Entretanto, a maior soroprevalência foi para os títulos 1:200 e 1:400. O sorovar NUP-1 foi isolado no Núcleo de Pesquisa em Zoonoses (NUPEZO) a partir de urina de cão com diagnóstico laboratorial e clínica de leptospirose.

Os resultados descritos na tabela 2, mostram a estatística descritiva do estudo e a frequência dos fatores de risco para a leptospirose na população estudada.

Os animais adultos maduros apresentaram maior soroprevalência, sendo observado que na faixa etária de 1 a 3 anos, 40 animais (12,58%) foram reagentes à SAM, e na faixa etária de 3 a 6 anos, 54 animais (16,9%). Os machos (71/22,3%) foram mais reagentes quando comparado com as fêmeas (65/20,4%).

Em um total de 133 animais vacinados, 57(42,8%) foram reagentes. Entretanto, para um total de 185 cães não vacinados, 79 (42,7%) foram reagentes à SAM.

Os animais que frequentaram a zona rural 101 (41,7%) foram sororeagentes de um total de 242 cães.

Para a presença de roedores é possível observar, que os animais que tiveram contato apresentaram 41,8% (128/318) de soroprevalência. Porém, os animais que não tiveram contato, apenas 8 (2,5%) amostras foram reagentes. Esses mesmos dados foram observados para a variável saneamento básico.

Os animais que tiveram acesso à rua apresentaram 40,5% (129 amostras) de soroprevalência, enquanto que os animais que não saem à rua 2,2% (7 amostras).

Em relação a presença de contactantes foi observada uma soroprevalência de 42,7% (136 cães). Os contactantes variavam entre outros cães, gatos, bovinos, equinos, aves e silvestres.

A variável “Enchente” apresentou um valor de soroprevalência de 33,6% (107 amostras), nos animais que não tiveram contato sendo que 9,1% dos animais (29 cães) tiveram contato e foram reagentes.

Em relação a variável “alimento à vontade” 22% (70 cães) foram reagentes, enquanto que em relação aos proprietários que retiravam os alimentos à noite observou-se a soroprevalência de 20,7% (66 cães) reagentes.

Os bairros foram divididos em zonas, observado que na zona sul a prevalência de animais reagentes foi maior com frequência de 18,2% (58 amostras), seguida da zona oeste tendo-se 11,6% (37 amostras) foram reagentes.

As análises realizadas com as variáveis do estudo individualmente, demonstraram que somente a variável “Zona Urbana” mostrou-se significativa ($p=0,0063$), e os resultados estão descritos tabela 3.

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%.

VARIÁVEIS	NÃO REAGENTE	REAGENTE	TOTAL (N)
FAIXA ETÁRIA			
< 1 ano	34 (10,6%)	22 (6,9%)	56 (17,6%)
1 - 3 anos	50 (15,7%)	40 (12,5%)	90 (28,3%)
3 – 6 anos	79 (24,8%)	54 (16,9%)	133 (41,8%)
6 – 9 anos	7 (2,2%)	13 (4,0%)	20 (6,2%)
> 9 anos	12 (3,7%)	7 (2,2%)	19 (5,9%)
GÊNERO			
Macho	93 (29,2%)	71 (22,3%)	164 (51,5%)
Fêmea	89 (27,9%)	65 (20,4%)	154 (48,4%)
VACINAÇÃO			
Não	106 (57,3%)	79 (42,7%)	185 (58,1%)
Sim	76 (57,1%)	57 (42,8%)	133 (41,8%)
ZONA RURAL			
Não	41 (53,9%)	35 (46,0%)	76 (23,9%)
Sim	141 (58,2%)	101 (41,7%)	242 (76,1%)
ZONA URBANA			
Centro	11 (3,4%)	3 (0,9%)	14 (4,4%)
Leste	17 (5,3%)	11 (3,4%)	28 (8,8%)
Norte	56 (17,6%)	27 (8,4%)	83 (26,1%)
Oeste	24 (7,5%)	37 (11,6%)	61 (19,1%)
Sul	74 (23,2%)	58 (18,2%)	132 (41,5%)
ACESSO À RUA			
Não	10 (3,1%)	7 (2,2%)	17 (5,3%)
Sim	172 (54,0%)	129 (40,5%)	301 (94,6%)
PRESENÇA DE CONTACTANTES			
Não	4 (1,2%)	0 (0,0%)	4 (1,2%)
Sim	178 (55,9%)	136 (42,7%)	314 (98,7%)
ENCHENTE			
Não	131 (41,1%)	107 (33,6%)	238 (74,8%)
Sim	51 (16,0%)	29 (9,1%)	80 (25,1%)
ALIMENTO À VONTADE			
Não	84 (26,4%)	66 (20,7%)	150 (47,1%)
Sim	98 (30,8%)	70 (22,0%)	168 (52,8%)

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.

VARIÁVEIS	GRAUS DE LIBERDADE	ESTATÍSTICA QUI-QUADRADO	p - VALOR
Faixa etária	4	4,94	0,2928
Sexo	1	0,03	0,8451
Vacinação	1	0,08	0,9781
Z.rural/Z.urbana	1	0,44	0,5069
Roedores	1	2,91	0,0880
Saneamento	1	1,95	0,1625
Acesso à rua	1	0,0186	0,8916
Contactantes	1	3,0271	0,0819
Enchente	1	1,8549	0,1732
Alimento	1	0,1763	0,6746
Zona urbana	1	14,34	0,0063*

* p-valores significativos menor ou igual a 0,05.

Para os valores de p menores ou iguais a 0,05 da tabela 3, foi calculado a razão de chances e seus respectivos intervalos de confiança (95%), que estão descritos na tabela 4. A única variável que apresentou diferença estatística foi a “Zona Urbana” ($p=0,0063$), para tanto foi calculada a razão das chances (OR = oddies ratio) na análise multivariável de regressão logística, sendo a variável “Enchente” mantida no modelo, pois foi considerada um fator de confusão.

A proporção de animais sororeagentes foi diferente entre as zonas urbanas. Para identificar quais zonas foram significativamente diferentes, foi realizada a razão das chances, onde a Zona Centro e Oeste, e Zona Norte e Oeste e Zona Oeste e Zona Sul apresentando diferenças estatísticas.

Portanto, a chance de um animal ser sororeagente na zona Oeste foi 5,1 (IC95%: 0,04; 0,78) vezes maior do que a chance de um animal ser sororeagente na zona Centro. A chance de um animal ser sororeagente na zona Oeste foi 3,5 (IC95%: 0,14; 0,58) vezes maior do que a chance de um animal ser sororeagente na zona Norte. A chance de um animal ser sororeagente na zona Oeste foi 2,3 (IC95%: 1,18; 4,38) vezes maior do que a chance de um animal ser sororeagente na zona Sul.

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.

ENCHENTE	ZONA	ENCHENTE	ZONA	ESTIMATIVA	IC 95%
0	Centro	1	Leste	0,432	0,097 – 1,931
	Centro		Norte	0,675	0,169 – 2,696
	Centro		Oeste	0,195	0,048 – 0,782*
	Centro		Sul	0,443	0,113 – 1,738
	Leste		Norte	1,562	0,624 – 3,910
	Leste		Oeste	0,450	0,178 – 1,140
	Leste		Sul	1,026	0,423 – 2,490
	Norte		Oeste	0,288	0,142 – 0,584*
	Norte		Sul	0,657	0,367 – 1,177
	Oeste		Sul	2,279	1,184 – 4,387*
				1,575	0,869 – 2,853

*intervalos $\leq 1,0$ = significamente diferente

Na figura 1 estão representados todos os bairros do município de Botucatu/SP. As amostras foram coletadas apenas nos bairros que estão hachurados e o número de amostras coletadas de cada bairro está representado seguindo as linhas.

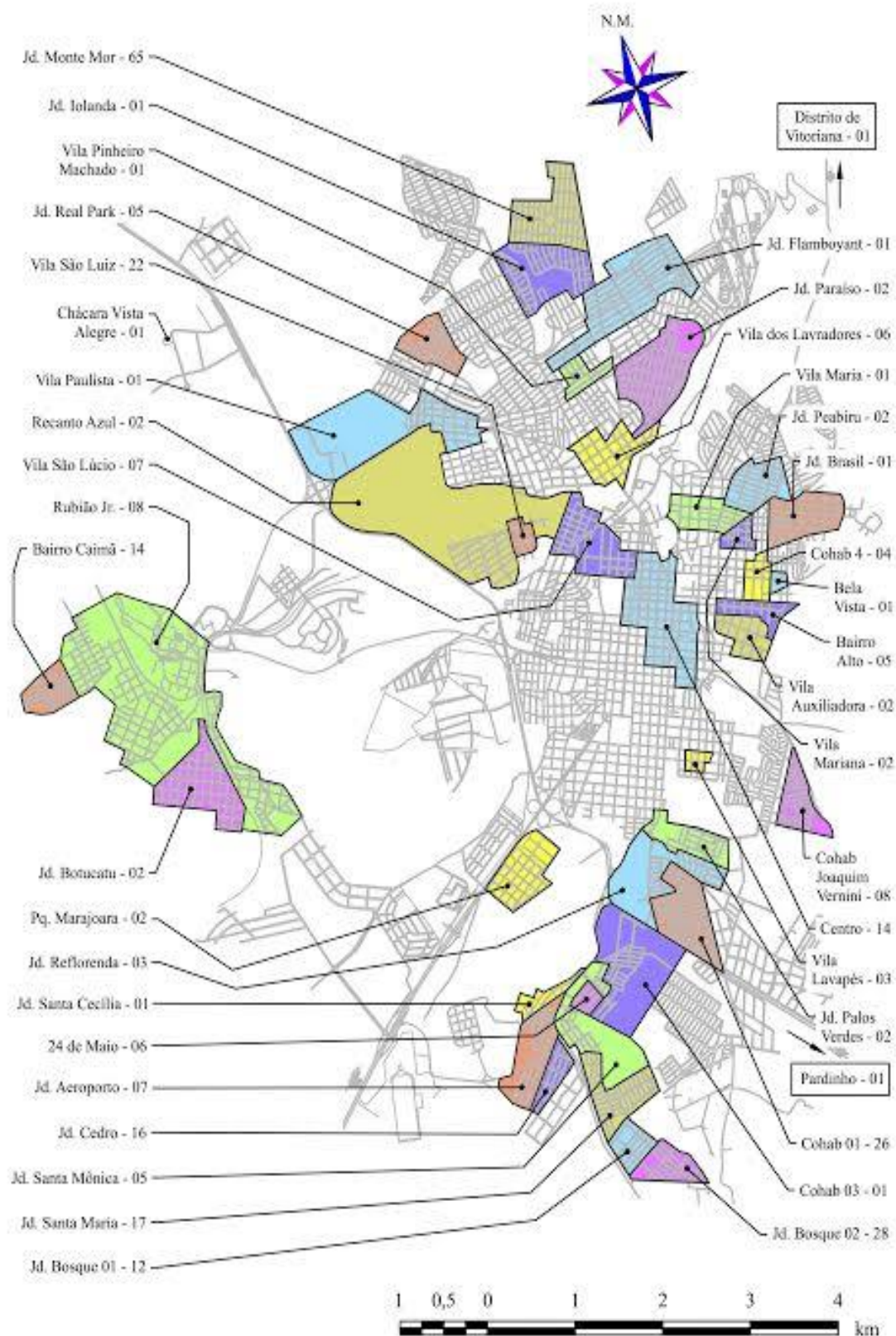


FIGURA 1: Mapa representativo do município de Botucatu/SP, com a indicação dos bairros abrangidos no estudo e respectiva distribuição das amostras analisadas em cada bairro.

Na tabela 5 estão representadas as frequências de alteração nos exames bioquímicos realizados nos animais que apresentaram reatividade para a SAM. Para todos os testes, a resposta positiva, representada como o 'SIM' na tabela, corresponde a um aumento acima dos valores de referência para a espécie (Anexo 4).

Foram encontradas diferenças estatísticas na correlação entre a soropositividade e alteração nas enzimas analisadas. Sendo elas, ureia ($p < 0,001$), creatinina ($p < 0,001$), ALT ($p < 0,001$), FA ($p < 0,001$), GGT ($p < 0,001$), BT ($p < 0,001$), BD ($p < 0,0028$) e potássio ($p < 0,036$). O N – Reagente representa a quantidade de animais que foram reagentes na SAM e também mostraram valores aumentados para as enzimas.

Os resultados obtidos a partir da PCR de urina dos 318 cães foram todos negativos, como pode ser visto na figura 2. Na extremidade da esquerda foi colocado marcador de peso molecular, e a única amostra que apresentou fluorescência foi o controle positivo de 330pb, demonstrando que a reação ocorreu de forma adequada.

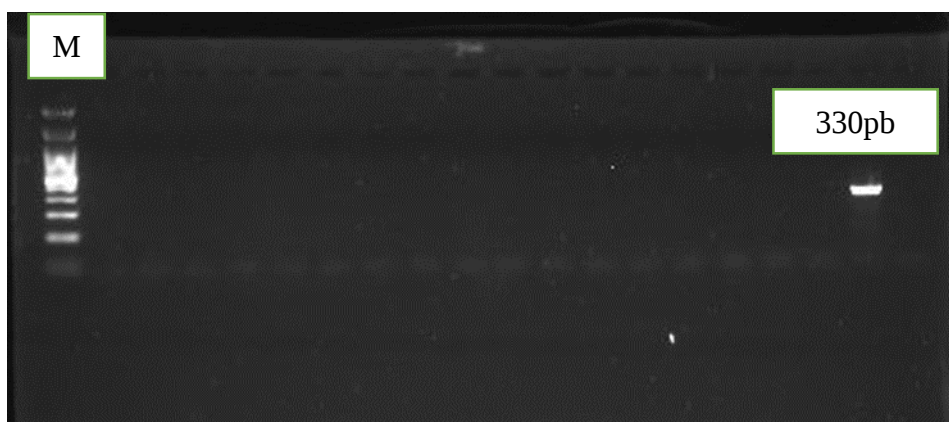


FIGURA 2: Gel de agarose a 2%, com presença de banca única fluorescente do controle positivo. Todas as amostras de urinas testadas apresentaram-se negativas. M = marcador de peso molecular 100 pb.

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.

VARIÁVEL	N - Total	N - Reagente	(%)	VALOR P
URÉIA				<0,001*
NÃO	111	7	6,3	
SIM	207	129	62,32	
CREATININA				<0,001*
NÃO	167	14	8,38	
SIM	151	122	80,79	
ALT				<0,001*
NÃO	126	12	9,52	
SIM	192	124	64,58	
FA				<0,001*
NÃO	238	80	33,61	
SIM	80	56	70,0	
GGT				<0,001*
NÃO	278	133	47,84	
SIM	40	3	7,50	
BT				<0,001*
NÃO	22	1	4,55	
SIM	296	135	45,61	
BD				<0,0028*
NÃO	31	6	19,35	
SIM	287	130	45,30	
CK				<0,103
NÃO	7	1	14,39	
SIM	311	135	43,41	
SÓDIO				<0,158
NÃO	13	4	30,77	
SIM	305	132	43,28	
POTÁSSIO				<0,036*
NÃO	64	22	34,38	
SIM	254	114	44,88	

Legenda: ALT (alanina aminotransferase), FA (fosfatase alcalina), GGT (gama glutamiltransferase), BT (bilirrubina total), BD (bilirrubina direta), CK (creatina quinase). * p-valores significativos menor ou igual a 0,05.

6. DISCUSSÃO

A prevalência de animais sororeagentes no estudo foi de 42,77%, diferentemente de outros estudos como o de Kikuti et al. (2012), encontrando a soroprevalência de 20%, o estudo de Langoni et al. (2013) a soroprevalência de 17%, e Modolo et al. (2006) a soroprevalência de 15% nas amostras analisadas. Entretanto, em outro estudo de Langoni et al. (2015), observou – se a prevalência de 39,1% de animais reagentes corroborando com o presente estudo.

É importante ressaltar que o sorovar identificado com maior frequência nesse estudo foi o Nupezo 01 (NUP), sorovar pertencente ao sorogrupo Canicola, isolado no Núcleo de Pesquisa em Zoonoses – NUPEZO a partir de urina canina. Dentre os 136 animais reagentes, 68 apresentaram título para o sorovar NUP (50%). Comparar outros relatos diferentes leptospiros adaptando aos sorovares e também da urbanização de animais silvestres.

Em seguida, em ordem de prevalência o sorovar mais prevalente foi o Gryppotyphosa com 42% (57). O sorovar Copenhageni 38% (52), Icterohaemorrhagiae 30% (42), Canicola 28% (39) e Cynopteri 28% (39) aparecem na sequência, diferindo dos resultados encontrados em literatura. Fonzar e Langoni (2012) na cidade de Maringá, Paraná, verificaram que os sorovares mais encontrados foram Pyrogenes (44%), Canicola (22%) e Copenhageni (19%). Segundo Morikawa et al., (2015), um estudo realizado com cães na cidade de Curitiba, os sorovares mais frequentes foram o Canicola e Icterohaemorrhagiae. Em um estudo realizado na cidade de Botucatu em 2006, em cães verificou-se o predomínio dos sorovares Castellonis (28%) e Autumnalis (19%) (MODOLO et al., 2006). Langoni e colaboradores (2015) verificaram que os mais prevalentes foram Copennhageni (23,73%), Icterohaemorrhagiae (16,95%) e Canicola (10,17%). Ciuffa e colaboradores em 2016 verificaram a soroprevalência de 14,4% de leptospirose, em cães destinados à castração eletiva. Foi encontrada em seu estudo soropositividade para os sorovares Canicola (10%), Icterohaemorrhagiae (3,3%) e Tarassovi (1%).

Em um estudo com cães provenientes de um canil comercial de Ribeirão Preto/SP, foi observado 34% de animais reagentes na SAM para *Leptospira*

spp. O sorovar mais frequente foi o Pomona, e não houve diferença significativa entre os machos (29%) e fêmeas (35%), e também entre os adultos (34%) e filhotes (14%) (TAVARES et al., 2016).

Cães machos são frequentemente mais acometidos do que as fêmeas, provavelmente pelos hábitos e comportamentos. Em nosso estudo, foi verificada a prevalência de 22,3% de cães machos reagentes e 20,4% de fêmeas reagentes, não sendo verificada diferença estatística. Assim como no estudo de SILVA-ZACARIAS e colaboradores (2014), que observaram a prevalência de 33,3% de cães machos e 25,5% de cães fêmeas sororeagentes. Os cães com acesso à rua 40,5% (129) apresentaram maior prevalência ao teste de SAM. Portanto, os cães caçadores e cães com acesso à rua também tem maior risco de infecção do que os cães que vivem em ambientes domésticos, provavelmente pelo hábito de passear nas ruas e parques tendo maior acesso à fonte de águas contaminadas, sendo considerado fator de risco para leptospirose (MAELE et al., 2008; AZÓCAR-AEDO et al., 2014).

No presente estudo, 99,6% (273) dos animais eram Sem Raça Definida (SRD), e não foram encontradas diferenças estatísticas com as raças analisadas, possivelmente pelo baixo número de animais amostrados de raças específicas. Todas as raças podem ser fonte de infecção ou apresentarem leptospirose, mas os cães SRD têm maior predisposição e apresentam maior fator de risco devido aos hábitos e lugares onde vivem (AZÓCAR-AEDO et al., 2014).

Em um estudo com 298 cães na Suíça foi verificado maior prevalência de leptospirose em cães adultos (5 a 9 anos – 47%), seguido de 20% de cães filhotes menores que um ano e 20% de cães jovens adultos de 1 a 4 anos (MAJOR et al., 2014). No Brasil, um estudo verificou 37,1% de prevalência entre os cães jovens adultos (1 a 5 anos) e 45,4% de prevalência entre os adultos (5 a 10 anos). Esses resultados corroboram com os dados do presente estudo, onde animais adultos (3 a 6 anos) apresentaram 16,9% de soropositividade e jovens adultos (1 a 3 anos) com 12,5% de sororeagentes.

Segundo Azócar-Aedo et al., (2014), cães que vivem em áreas urbanas tem 1,58 vezes mais chances de contrair a doença do que os que vivem em áreas rurais, devido à existência de hospedeiros reservatórios em áreas urbanas, como demonstrado pela detecção de leptospiras em rins de ratos

capturados na região urbana de Tóquio, Japão (KOIZUMI, et al., 2008). A presença de leptospirose em áreas urbanas também pode ser associada com o aumento da população vivendo em áreas de risco, em condições precárias de higiene, facilitando a transmissão de leptospirose entre os cães (PICARDEAU, 2013). Foi demonstrado no presente estudo que tanto os animais que frequentaram a zona rural (41,7%) quanto os animais que não frequentaram (46,0%) são sororeagentes para o gênero *Leptospira*.

Os animais imunizados apresentaram 42,8% (157 cães) de soroprevalência, enquanto os não vacinados apresentaram 42,7% (79 cães). Os animais que foram reagentes na SAM, de acordo com o questionário respondido pelos proprietários, receberam a última dose de vacina há mais de quatro meses. Em geral, cães vacinados desenvolvem baixos títulos de anticorpos aglutinantes (100 a 400), os quais são detectados na SAM por até três meses após vacinação (MODOLO et al., 2006). Portanto, podemos considerar que os animais desse estudo que apresentaram título 100, não tiveram interferência vacinal.

No presente estudo, 100% das amostras de urina testadas através da PCR foram negativas. Mesmo quando os animais apresentam altos títulos anti-leptospira nos testes sorológicos, a não detecção do agente em amostras de urina pela técnica da PCR pode acontecer. Esse evento ocorre em algumas situações, como por exemplo quando os animais testados foram infectados, apresentando ou não a doença, e podem ter eliminado o agente; quando os altos títulos sorológicos resultam de uma resposta vacinal e não de uma infecção natural; e, por fim, quando a infecção é muito recente (SHUMABUKURO et al., 2003; OIE, 2012; ZIMMERMAN et al., 2012).

Segundo Rojas et al. (2010), pesquisas sorológicas reportam que mais de 20% das amostras de soro de cães, apresentam anticorpos específicos para os sorovares de *Leptospira*. Entretanto, é difícil de relacionar os achados da sorologia com a prevalência de portadores crônicos e leptospirose, os quais são normalmente negativos ou apresentaram baixos títulos de anticorpos.

A PCR é uma técnica muito utilizada e promissora, pois detecta a doença precocemente e também é útil na detecção de pacientes portadores assintomáticos. A técnica é mais sensível, mais específica e mais rápida que a

cultura, porém, a sorologia é capaz de detectar a doença já na primeira semana (BAL et al, 1994).

Em um estudo na Irlanda, 7% dos cães domésticos tinham leptospira na urina. Nos EUA, também foi reportada a presença de leptospira em 8% dos cães analisados. Entretanto, no Irã, foi descrito a presença de leptospira na urina em 22% dos animais. No estudo de Rojas et al (2010), foi encontrado baixa prevalência de animais positivos na PCR, sugerindo que foi analisado pouco volume de urina (300 µl) comparado com outros estudos. Também, sugerido que o primer específico para LipL 32 é menos sensível que o primer para o gene 23S e 16S ribossomal RNA de *Leptospira interrogans* (GenBank [X17547.1]), que amplifica uma região com 330 pb. No presente estudo foi utilizado o primer 16S do rRNA de *Leptospira interrogans*, não havendo animais positivos. Utilizou-se maiores volumes de urina, mínimo de 5 mL coletados, entretanto sem resultados positivos na PCR.

As alterações laboratoriais mais comuns encontradas na leptospirose, são o aumento das enzimas hepáticas (ALT, FA ou AST), azotemia e distúrbios eletrolíticos (hipocloremia, hipocalemia e hiponatremia) (MAELE et al., 2008).

O rim é o órgão alvo na infecção por *Leptospira* sp. ou spp. A incidência de lesão renal aguda é de 40% a 60% dos indivíduos acometidos, assim como a ocorrência de hipocalemia. Esta alteração é um marcador de falta de função renal em pacientes com leptospirose e injúria renal aguda. O aumento da creatinina sérica e CK sugere que a rabdomiólise contribui para a IRA, aumentando os níveis de K (SEGURO e ANDRADE, 2013).

Os resultados obtidos servem como um alerta em relação ao potencial zoonótico da leptospirose canina, e também no que diz respeito à exposição dos proprietários a alguns dos fatores de risco a que os cães também estiveram expostos. O animal infectado e assintomático, pode eliminar leptospiras viáveis pela urina por longos períodos e de forma intermitente, podendo ser considerado responsável pela persistência de foco da doença e fonte de manutenção do agente no ambiente.

6.1 LIMITAÇÕES

As amostras negativas à PCR ocorreram devido à falta de realização de novas coletas, no mesmo dia, ou em dias seguidos, pois na amostra colhida não foi detectado o micro-organismo, tendo em vista que a eliminação é intermitente, portanto deveríamos ter realizado mais coletas para acompanhamento dos cães. Esse procedimento não foi realizado devido à falta de financiamento, pois não tivemos reserva técnica e tampouco auxílio para o projeto. Todos os custos de materiais consumíveis, reagentes, kits de extração e até descartáveis, foram comprados com verba pessoal. Também devemos ressaltar que muitos proprietários se mostraram refratários ao procedimento de cistocentese, e não autorizariam as coletas diárias, mesmo esclarecidos sobre os riscos mínimos.

O cultivo das urinas não foi realizado, devido à distância e localização das coletas, muitos bairros se localizam na periferia oposta à Universidade, e as amostras não chegariam viáveis ao laboratório.

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 Saunderson 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, 6ª 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. 1ª 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

ANEXO 1

(FRENTE)

INQUÉRITO EPIDEMIOLÓGICO

DADOS DO ANIMAL

Nome do animal: _____ Idade: _____ Sexo: M / F
 Raça: _____

IDADE:

1. ☐ < 12 MESES
2. ☐ 1-5 ANOS
3. ☐ > 5 ANOS

1. Seu animal é vacinado contra Leptospirose? SIM ☐ NÃO ☐
2. Se seu animal é vacinado, quando foi a data da última dose? _____
3. Vive em zona rural ☐ ou urbana ☐ ?
4. Tem acesso à zona rural esporadicamente? SIM ☐ NÃO ☐
5. Você já encontrou roedores em sua residência ou o seu animal possui o hábito de caçar roedores? SIM ☐ NÃO ☐
6. Em seu bairro há saneamento básico? SIM ☐ NÃO ☐
7. Seu animal tem livre acesso à rua? SIM ☐ NÃO ☐
8. Seu animal tem contato com outros animais? SIM ☐ NÃO ☐
9. Se sim, qual a (s) espécie (s) dos animais que estão em contato com o seu animal? ☐ CANINO ☐ FELINO ☐ AVES ☐ BOVINO ☐ EQUINO ☐ SILVESTRES ☐ OUTROS: ☐ _____
10. Seu animal tem acesso a áreas onde ocorrem enchentes? SIM ☐ NÃO ☐
11. O alimento (Ração e água) é retirado do quintal a noite? SIM ☐ NÃO ☐

(VERSO)

DADOS DO PROPRIETÁRIO

Nome do Proprietário: _____

CPF/RG: _____

Endereço: _____

Bairro: _____

CEP: _____ Telefone: _____ / Celular () _____

Assinatura do proprietário/responsável

Data: ____ de ____ de 20____.

ANEXO 2



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Declaro para os devidos fins que estou ciente e autorizo a realização do procedimento de coleta de sangue e urina (cistocentese) do referido animal de minha propriedade, referente ao Projeto de Pesquisa intitulado "Prevalência de cães portadores assintomáticos do gênero *Leptospira*, no município de Botucatu, São Paulo", de responsabilidade da aluna de Doutorado Vívian Ferreira Zadra.

Nome do animal: _____

Nome do Responsável: _____

RG: _____ Data: ____ / ____ / ____

Assinatura: _____

ANEXO 3

ANEXO 4

Valores de referência utilizado no estudo para os exames bioquímicos e eletrólitos para a espécie canina

BIOQUÍMICOS	VALOR DE REFERÊNCIA
Ureia (mg/dL)	21,4 – 59,92
Creatinina (mg/dL)	0,5 – 1,5
Alanina Aminotransferase (UI/L)	21 – 45
Fosfatase Alcalina (UI/L)	20 – 156
Gamaglutamiltransferase (UI/L)	6,1 – 17,4
Bilirrubina Total (mg/dL)	0,1 – 0,3
Bilirrubina Direta (mg/dL)	0,06 – 0,12
Creatina quinase (UI/L)	1,15 – 28,40
ELETRÓLITOS	VALOR DE REFERÊNCIA
Sódio (mEq/L)	141,1 – 152,3
Potássio (mEq/L)	4,37 – 5,65

Adaptado de: KANEKO, 1997; MEYER & HARVEY, 2004; Laboratório Clínico Veterinário da FMVZ – UNESP, Botucatu.

ANEXO 5

Frequência e porcentagem dos sorovares e títulos de anticorpos dos cães provenientes do HV da FMVZ – UNESP, Botucatu –SP, Canil Municipal e domiciliados na cidade de Botucatu – SP que foram reagentes à um ou mais sorovares a SAM.

Observações: Um mesmo animal pode reagir para mais de um sorovar considerando-se como responsável pela infecção o de maior título, e como co-aglutinantes os demais sorovares reagentes.

Sorologia	Frequência	Porcentagem	Frequência Acumulativa	Porcentagem Acumulativa
5 (1:200)				
7(1:200)				
9 (1:200)	1	0.31	1	0.31
NUP (1:200)				
11 A (1:200)	1	0.31	2	0.63
11B (1:200)				
11A (1:100)	1	0.31	3	0.94
11A (1:200)	7	2.20	10	3.14
11B (1:200)				
11A (1:400)	1	0.31	11	3.46
11B (1:400)				
11A (1:400)	2	0.63	13	4.09
11B (1:400)				
NUP (1:400)				
11A (1:400)	9	2.83	22	6.92
11B (1:400)				
11A (1:800)	4	1.26	26	8.18
11B (1:800)				
NUP (1:400)				
11B (1:100)	1	0.31	27	8.49
11B (1:100)				
15 (1:1600)	1	0.31	28	8.81
16A(1:400)				
NUP (1:800)				
14 A (1: 200)	3	0.94	31	9.75
15 (1: 200)				
15 (1:200)	1	0.31	32	10.06
15(1:200)	1	0.31	33	10.38

Sorologia	Frequência	Porcentagem	Frequência Acumulativa	Porcentagem Acumulativa
NUP (1:100)				
15(1:800) NUP (1:1600)	2	0.63	35	11.01
1A (1:100) 11A (1:200) NUP (1:200)	1	0.31	36	11.32
1A (1:200) 1B (1:200) 5 (1:400) 9 (1:800) NUP (1:400)	5	1.57	41	12.89
1A(1:200) 11A(1:200) 11B(1:200)	2	0.63	43	13.52
1A(1:200) 11A(1:200) 11B(1:200) NUP (1:200)	1	0.31	44	13.84
5 (1: 100) 7 (1:100)	1	0.31	45	14.15
5 (1:200) 7 (1:200) 9 (1:200)	3	0.94	48	15.09
5 (1:200) 7 (1:200) 9 (1:200) NUP (1:200)	1	0.31	49	15.41
5(1:200) 9 (1:200) 11A (1:200) 11B(1:200)	1	0.31	50	15.72
5 (1:200) NUP (1:200)	2	0.63	52	16.35
5 (1:200) NUP (1:800)	1	0.31	53	16.67
5(1:400) 11A (1:400) 11B (1:400)		0.31	54	16.98
5(1:400)	1	0.31	55	17.30

Sorologia	Frequência	Porcentagem	Frequência Acumulativa	Porcentagem Acumulativa
7 (1: 400) 9 (1:400)				
5 (1:400) 7 (1:200) 9 (1:200) NUP (1:200)	1	0.31	56	17.61
5 (1:400) 7 (1:400)	2	0.63	58	18.24
5(1:400) 7 (1:400) 9 (1:400)	8	2.52	66	20.75
5(1:400) 9 (1:400)	1	0.31	67	21.07
5 (1:400) 9 (1:400) NUP (1:400)	2	0.63	69	21.70
5(1:400) NUP(1:400)	5	1.57	74	23.27
5 (1:800) 7 (1:800)	1	0.31	75	23.58
5(1:100) 9 (1:200) 11A(1:200)	1	0.31	76	23.90
5(1:200) 7(1:200) NUP (1:400)	1	0.31	77	24.21
7 (1:100) 9 (1:200) 11A (1:200) NUP (1:800)	1	0.31	78	24.53
7 (1:200) 9 (1:400) NUP (1:400)	1	0.31	79	24.84
7 (1:200) NUP (1:200)	1	0.31	80	25.16
7 (1:400) NUP (1:400)	4	1.26	84	26.42
7 (1:400) 9 (1:400)	5	1.57	89	27.99

Sorologia	Frequência	Porcentagem	Frequência Acumulativa	Porcentagem Acumulativa
7 (1:800) 9 (1:800)	1	0.31	90	28.30
7 (1:800) NUP (1:800)	1	0.31	91	28.62
7(1/100) 16A (1:100) NUP (1/100)	2	0.63	93	29.25
7(1:100) 8A(1:100) 11A(1:200) 15(1:100) NUP (1:400)	1	0.31	94	29.56
7(1:100) 8A (1:100)	1	0.31	95	29.87
7(1:200) 9(1:800) 11A (1:400) 14A(1:200) NUP (1:800)	1	0.31	96	30.19
9 (1:100) 11A (1:100) 11B (1:100)	1	0.31	97	30.50
9 (1:200) 11 A (1:200)	1	0.31	98	30.82
9 (1:200) 11A (1:400) 11B (1:400) NUP (1:400)	1	0.31	99	31.13
9 (1:200) NUP (1:200)	3	0.94	102	32.08
9 (1:400)	2	0.63	104	32.70
9 (1:400) 11A (1:400)	1	0.31	105	33.02
9 (1:400) 11A (1:400) 11B (1:200)	2	0.63	107	33.65
9 (1:400) 11A (1:400) 11B (1:400)	6	1.89	113	35.53

Sorologia	Frequência	Porcentagem	Frequência Acumulativa	Porcentagem Acumulativa
9 (1:400) 11B (1:400)	1	0.31	114	35.85
9 (1:400) NUP (1:400)	3	0.94	117	36.79
9 (1:800) 11 A (1:400)	1	0.31	118	37.11
9 (1:800) 11A (1:800)	2	0.63	120	37.74
NR	180	56.60	300	94.34
NUP (1:100)	2	0.63	302	94.97
NUP (1:200)	5	1.57	307	96.54
NUP (1:200) 11A (1:200)	2	0.63	309	97.17
NUP (1:400)	7	2.20	316	99.37
NUP (1:800)	1	0.31	317	99.69
NUP 1:100	1	0.31	318	100.00

CAPÍTULO II

***“Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor,
mas lutamos para que o melhor fosse feito ...
Não somos o que deveríamos ser.
Não somos o que queríamos ser.
Mas, graças a Deus,
Não somos o que éramos.”***

Martin Luther King

10. ARTIGO CIENTÍFICO

Trabalho a ser enviado para a revista ***Preventive Veterinary Medicine***.

10.1 Normas de Publicação da Revista:

<https://www.elsevier.com/journals/preventive-veterinary-medicine/0167-5877/guide-for-authors>

Leptospira infection in dogs: a serological, biochemical and molecular study, and evaluation of risk factors

**ZADRA, V.F.¹; TOZATO, C.C.²; SILVA, M.A.R.X.¹; MACHADO, D.M.R.¹;
ROSSI, R.¹; LANGONI, H.¹; PAES, A.C.¹**

1 - Department of Veterinary Hygiene and Public Health, São Paulo State University (Unesp), School of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu

2 - São Paulo State University (Unesp), Institute of Biosciences, Botucatu

Correspondence: vzadra@gmail.com

ABSTRACT

Leptospirosis is among the leading zoonoses worldwide. Domestic and wild animals are key links in the transmission 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 aim of this study was to evaluate healthy dogs as asymptomatic carriers for the genus *Leptospira* spp. 318 samples were evaluated by the microscopic serum agglutination (SAM), polymerase chain reaction (PCR) for *Leptospira* spp, and biochemical. 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%), and Icterohaemorrhagiae (42%), of 42.77% total seroreagents. No positive samples were identified by PCR. The statistically significant risk factor was the urban zone, 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 is 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, diagnosis of carriers.

INTRODUCTION

Leptospirosis is a global importance zoonosis caused by bacteria of the genus *Leptospira* (DAHER; ABREU; SILVA JUNIOR, 2010; GOLDSTEIN, 2010). *Rattus norvegicus* (rat) is the most important reservoir of *Leptospira* spp., mainly in urban areas, being the maintenance hosts of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni and *Icterohaemorrhagiae*, both belonging to the serogroup *Icterohaemorrhagiae*, responsible for causing severe jaundice in animals and humans (VIEGAS et al., 2001, DAHER, ABREU and SILVA JUNIOR, 2010).

Dogs displays an important role in the spread of the disease, acting as a source of infection for humans, due to the close relationship between those species. Even after treatment, many dogs may remain unapparent renal carriers of *Leptospira* spp. for an indefinite period, and they can eliminate this bacterium through the urine in the environment for weeks, months or even years, putting in risk other animals and humans. In this context, the dogs follow as disseminators of leptospires representing a great risk to public health (MODOLO et al., 2006, MAGALHÃES et al., 2007, AZÓCAR-AEDO et al., 2014).

The epidemiological study of leptospirosis is hampered by the diversity of serovars, regional variations, as well as domestic species affected (GOLDSTEIN, 2010). Due to the great difficulty of cultivation and isolation of leptospires, serology becomes the most used diagnostic method in the epidemiological surveys of leptospirosis (SILVA et al., 2009; MORIKAWA, et al., 2015). The identification of asymptomatic carriers is a reason of great concern from the point of public health, as well as for the veterinary clinical (KOIZUMI, et al., 2013).

The present study aimed to evaluate the prevalence of asymptomatic dogs with leptospirosis in the city of Botucatu, SP, Brazil, by serology using the SAM technique, PCR from urine, biochemical profile and application of epidemiological questionnaire to the owners to identify the risk factors.

MATERIAL AND METHODS

Calculation of sample size

The Epi Info 3.5.1 software (CDC, 2008) was used to determine the minimum number of samples, adopting 10% of expected prevalence, 95% confidence level and 5% margin of error. The total population of dogs of the city was calculated in approximately 27,000 dogs in the year 2014. Then, 318 dogs were used from the routine of Veterinary Hospital - UNESP, and dogs domiciled of the city of Botucatu/SP. No selection breed, sex or age was done.

Animals

The present study was approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of FMVZ / UNESP / Botucatu, SP, protocol CEUA number 29/2016. The animals used in the study did not present clinical signs compatible with the clinical disease and did not receive immunization against leptospirosis in the last four months. They were submitted to physical evaluation to detect any signal compatible with leptospirosis. For collection of samples and inclusion in the study, the owners of the animals completed and signed a Free and Informed Consent Form.

Collection of biological samples

Blood samples were collected for serology (SAM) and urine for PCR, both processed at the Laboratory of Diagnostics of Zoonoses and Service of Molecular Biology Applied to Zoonoses of the Department of Veterinary Hygiene and Public Health of FMVZ - UNESP, Botucatu.

Five mL of blood were collected by jugular or cephalic venipuncture with a 5.0 mL disposable syringe and a 30 x 8 mm needle. The blood was transferred to a dry tube and centrifuged at 3,000 RPM for 10 minutes to obtain serum, which was stored in a 1.5 mL microtube in a freezer at -20 ° C until processing. The urine was collected by cystocentesis (females) and by catheterization (males), and storage in Eppendorf tubes RNase and DNase free with PBS solution, pH 7.6, diluted in a ratio of 1: 1, and maintained in freezer at - 20 °C until use.

Diagnostic exams

Microscopic Soroagglutination (SAM)

The Microscopic Soroagglutination (SAM) test was performed at the Zoonoses Diagnostic Laboratory of FMVZ - UNESP, Botucatu - SP, following the norms of the Ministry of Health (BRASIL, 1995). *Leptospira* spp. cultures were used as antigens, they were kept in an oven from 28°C to 30°C.

Serum from the animals was tested in the SAM against 12 serovars. As antigen, cultures of leptospires standard strains maintained weekly in Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) medium (DIFCO Laboratories®), were used.

The degree of agglutination was evaluated for each serovar, considering positive those with 50% or more agglutination, i.e., at least 50% agglutinated leptospires, and 50% free, against reference to the respective controls. The titration was performed per the serum that presented 50% agglutination or more in the screening test, and was performed only for the serovars reagents in the screening test. The endpoint was determined from an initial dilution of 1: 100. The cutoff point for positive agglutination reaction was defined as a titer greater than or equal to 100 (WHO, 2003). The highest dilution of serum capable to agglutinating 50% or more of leptospires in relation to the control is considered as titre (BRASIL, 1995).

Biochemical analyzis

The serum of the animals included in the study was tested for a renal and hepatic profile, with the following tests: urea, creatinine, alanine aminotransferase (ALT), gamma glutamyltranspeptidase (GGT), alkaline phosphatase (AF), bilirubin, Creatinine kinase (CK), and electrolytes such as sodium and potassium.

Molecular diagnosis

Urine samples were processed at the Laboratory of Molecular Biology of Zoonoses of FMVZ - UNESP, Botucatu - SP. Each sample was washed in sterile buffered saline (SST), pH 7.6, prior to freezing, to remove proteins and ions that could interfere with the PCR reaction. Each urine sample was centrifuged at 11,000 g, the supernatant was discarded, and the pellet was

washed in SST using an automatic vortex-type agitator (IKA®) by approximately 10 seconds. The procedure was repeated and the pellet resuspended in a final solution of 1 mL of SST, for obtaining a high cellular concentration in the urine, which was stored at -80 °C to proceed with the extraction.

The genomic DNA was extracted using the commercial DNA extraction kit, Illustra Blood Prep Mini Spin kit (GE Healthcare®, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), according to the manufacturer's instructions.

DNA amplification was performed using *Leptospira*-specific primers described by Mérien et al. (1992), corresponding to nucleotides 38 to 57 (LEP-1, 5'-GGCGGC-GCGTCTTAAACATG-3') and 348 to 369 (LEP-2, 5'-TTCCCCCATTG-AGCAAGATT-3'), of the primary structure of the gene 16S rRNA from *Leptospira interrogans* serovar Canicola.

DNA amplification was performed according to Merien et al. (1992), with some modifications. Each 0.2 mL reaction tube received 2.5 µl of PCR buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0), 0.5 µl of MgCl₂ (1.5 mM) (Invitrogen®), 0.5 µl of dNTP solution (200 µM) (Invitrogen®), 1.0 µL of each oligonucleotide (10 µmol) (RTD), 16.0 µl Ultra-pure water (Gibco®), 0,5 µL of Taq platinum polymerase (5U / µL) and 3 µl of DNA obtained on extraction. Amplification was performed with an initial denaturation cycle at 94 °C consisting of 3 minutes, followed by 30 cycles of 94 °C for 1 minute, annealing at 63 °C for 1.5 minutes, and a final extension at 72 °C for 2 Minutes to complete the extension of the amplicons. Positive samples resulted in a 331 bp product.

In order to visualize the products obtained, the horizontal electrophoresis was used. Banding was performed under ultraviolet light (296 nm) in a transilluminator, and then photographed and recorded using the GelDOC®it, UVP, GelDoc-IT™ (Imaging System) photodocumentation system, and Vision Works® LS Software. The definition of positive results was based on the presence of bands in the agarose gel, taking the positive control as reference.

Epidemiological questionnaire

Regarding each animal, an epidemiological questionnaire was used to study the risk factors associated with *Leptospira* spp. The questions were formulated to verify the various possibilities of exposure of the animals to the agent.

The questionnaire was based on the epidemiology of leptospirosis, considering the situation of the animals, if they had access to the street, vaccination status, the different species that they live with (e.g. other dogs, cats, cattle, horses, birds, wild animals), the local city, areas of flood, as well as the presence of rodents and the availability of food in the owner residences.

Statistical analysis

The prevalence of asymptomatic carriers and their 95% confidence interval was estimated in the studied population of 318 dogs. The distribution of frequencies of various serovars of animals seroreagent was evaluated.

Next, the association between serology for leptospirosis and the risk factors obtained through the questionnaire, and biochemical examination was evaluated (PROC FREQ, SAS Institute, 2011). Factors that presented P value <0.25 were analyzed for final multivariate analysis. Logistic regression models were constructed to estimate the chances of seroreactivity to leptospirosis as a function of the risk factors obtained with the questionnaire and biochemical examination (PROC GLIMMIX, SAS Institute, 2011). Terms of interaction and confounding factors among risk factors were included in the model and, remained it, if they were significant.

RESULTS and DISCUSSION

The prevalence of seroreagent animals in the study was 42.77%, unlike other studies such as Kikuti et al. (2012), had the seroprevalence of 20%, the study of Langoni et al. (2013) showed the seroprevalence of 17%, and Modolo et al. (2006) the seroprevalence of 15% in the samples analyzed. However, in another study by Langoni et al. (2015), the seroprevalence was 39%, corroborating with the current study.

It is important to note that the most frequently identified serovar in this study was Nupezo 01 (NUP), a serovar belonging to the Canicola serogroup, isolated from the Zoonoses Research Center - NUPEZO from canine urine. Of the 136 reactive animals, 68 presented titers for the serovar NUP (50%).

Then, the prevalent serovars were Gryppotyphosa with 42% (57), serovar Copenhageni 38% (52), Icterohaemorrhagiae 30% (42), Canicola 28%

(39) and *Cynopteri* 28% (39), differing from results found in the literature. Fonzar and Langoni (2012) in the city of Maringá, Paraná, identified the most common serovars as *Pyrogenes* (44%), *Canicola* (22%) and *Copenhageneri* (19%). According to Morikawa et al., (2015), a study carried out with dogs in the city of Curitiba, the most frequent serovars were *Canicola* and *Icterohaemorrhagiae*. In a study carried out in the city of Botucatu in 2006, dogs were found to be predominant in the *Castellonis* (28%) and *Autumnalis* (19%) serovars (MODOLO et al., 2006). Langoni et al. (2015) showed that the most prevalent were *Copenhageneri* (23.7%), *Icterohaemorrhagiae* (16.9%) and *Canicola* (10.1%). Ciuffa et al. in 2016 verified the seroprevalence of 14.4% of leptospirosis in dogs for elective castration. Seropositivity was found in the serovars *Canicola* (10%), *Icterohaemorrhagiae* (3.3%) and *Tarassovi* (1%).

In a study with dogs from a commercial kennel of Ribeirão Preto / SP, 34% of animals were observed in the SAM. The most frequent serovar was the *Pomona*, and there was no significant difference between males (29%) and females (35%), and also between adults (34%) and pups (14%) (TAVARES et al., 2016).

Male dogs are often more affected than females, probably by habits and behaviors. In our study, the prevalence of 22.3% of male reactive dogs and 20.4% of female reactors was verified, and no statistical difference was verified. As in the study by SILVA-ZACARIAS et al. (2014), they observed the prevalence of 33.3% of male dogs and 25.5% of female dogs. The dogs with access to the street 40.5% (129) presented higher prevalence to the SAM test. Therefore, hunting dogs and dogs with access to the street are also at higher risk of infection than dogs living in domestic environments, probably because of the habit of walking the streets and parks having greater access to contaminated water, being considered a risk factor for leptospirosis (MAELLE et al., 2008; AZÓCAR-AEDO et al., 2014).

In the present study, 99.6% (273) of the animals were No Race Defined (SRD), and no statistical differences were found with the races analyzed, possibly because of the low number of animals sampled from specific breeds. In a study of 298 dogs in Switzerland, a higher prevalence of leptospirosis was observed in adult dogs (5 to 9 years old - 47%), followed by 20% of puppies less than one year old and 20% of young adult dogs aged 1 to 4 years (MAJOR

et al., 2014). In Brazil, one study found a prevalence of 37.1% among young adult dogs (1 to 5 years old) and 45.4% prevalence among adults (5 to 10 years old). These results corroborate the data from our study, where adult animals (3 to 6 years old) had 16.9% seropositivity and young adults (1 to 3 years old) with 12.5% seroreagents.

According to Azócar-Aedo et al., (2014), dogs living in urban areas are 1.58 times more likely to contract the disease than those living in rural areas due to the existence of reservoir hosts in urban areas, as demonstrated by the detection of leptospires in rat kidneys captured in the urban region of Tokyo, Japan (KOIZUMI, et al., 2008). The presence of leptospirosis in urban areas may also be associated with an increase in the population living in areas of risk, in poor hygiene conditions, facilitating the transmission of leptospirosis among dogs (PICARDEAU, 2013). It was demonstrated in our study that both the animals that had contact with the rural area (41.7%) and the animals that did not have (46.0%) are seroreagent for the genus *Leptospira*.

The vaccinated animals presented 42.8% (157 dogs) of seroprevalence, while the non vaccinated ones had 42.7% (79 dogs). The animals that were reagents in SAM, according to the questionnaire answered by the owners, received the last dose of vaccine applied more than four months ago. In general, vaccinated dogs develop low titers.

In general, vaccinated dogs develop low titers of binding antibodies (100 to 400), which are detected in the SAM for up to three months after vaccination (Modolo et al., 2006). Therefore, we can consider that the animals of this study that presented titre 100, did not have vaccine interference.

In our study, 100% of the urine samples tested by PCR were negative. Even when the animals have high anti-leptospira titers in the serological tests, the non-detection of the agent in urine samples through the PCR technique can happen. This event occurs in some situations, for example when the animals tested were infected, presenting or not with the disease, and may have eliminated the agent; when high serological titers result from a vaccine response and not from a natural infection; and finally, when the infection is very recent (SHUMABUKURO et al., 2003; OIE, 2012; ZIMMERMAN et al., 2012). PCR is a widely used and promising technique, since it detects the disease early and is also useful in the detection of asymptomatic carriers. The technique

is more sensitive, more specific and faster than the culture, however, the serology is able to detect the disease in the first week (BAL et al, 1994).

In one study in Ireland, 7% of domestic dogs had leptospira in the urine. In the USA, the presence of leptospira in 8% of the dogs analyzed was also reported. However, in Iran, the presence of leptospira in urine was reported in 22% of the animals. In the study by Rojas et al (2010), a low prevalence of positive animals was found in the PCR, suggesting that a small volume of urine (300 µl) was analyzed compared to other studies. Also, it has been suggested that primer specific for LipL 32 is less sensitive than the primer for the 23S and 16S ribosomal RNA gene of *Leptospira interrogans* (GenBank [X17547.1]), which amplifies a region with 330 bp. In the present study, the 16S primer of the *Leptospira interrogans* rRNA was used, and there were no positive animals. We used larger volumes of urine, minimum of 5 mL collected, also not obtaining positive in the PCR.

The most common laboratory abnormalities found in leptospirosis are increased liver enzymes (ALT, FA or AST), azotemia and electrolyte disturbances (hypochloremia, hypokalemia and hyponatremia) (MAELE et al., 2008).

The kidney is the target organ in *Leptospira* sp. or spp. The incidence of acute renal injury is 40% to 60% of the individuals affected, as well as the occurrence of hypokalemia. This change is a marker of lack of renal function in patients with leptospirosis and acute renal injury. Increased serum creatinine and CK suggest that rhabdomyolysis contributes to ARF, increasing K levels (SEGURO and ANDRADE, 2013).

The results obtained serve as an alert to the zoonotic potential of canine leptospirosis, as well as to the owners' exposure to some of the risk factors to which the dogs were also exposed. The infected and asymptomatic animal can eliminate leptospires via the urine for long periods and intermittently and can be considered responsible for the persistence of the disease focus and source of agent maintenance in the environment.

LIMITATIONS

PCR-negative samples occurred due to the lack of new collections on the same day or on consecutive days, since the microorganism was not detected in the

sample, since elimination is intermittent, so we should have done more collections for the dogs. This procedure was not carried out due to the lack of funding, since we had no technical reserve nor any aid for the project. All costs of consumables, reagents, extraction kits and even disposables were purchased with personal funds. It should also be noted that many owners were refractory to the cystocentesis procedure and would not authorize daily collections, even if they were clear about the minimal risks.

Urine culture was not performed because of the distance and location of the collections, many neighborhoods are located on the periphery opposite the University, and the samples would not be viable in the laboratory

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

REFERENCES

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.

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.

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

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

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.

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.

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.

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.

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.

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.

MODELO, J. R.; LANGONI, H.; PADOVANI, C. R.; SHIMABUKURO, F. H.; MENDONÇA, A. O.; VICTORIA, C.; SILVA, W. B. Investigação soroepidemiológica 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.

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.

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.

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.; DURSKI, 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.

SHIMABUKURO, F. H.; DOMINGUES, P. F.; LANGONI, H. et al. Pesquisa de suínos portadores renais de leptospiras 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.

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.

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.

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