

UNIVERSIDADE SANTO AMARO

Mestrado em Medicina e Bem Estar Animal

Eduardo Alberto dos Reis

**LEPTOSPIROSE CANINA EM POPULAÇÕES ASSINTOMÁTICAS
DO ESTADO DE SÃO PAULO**

São Paulo

2020

Eduardo Alberto dos Reis

**LEPTOSPIROSE CANINA EM POPULAÇÕES ASSINTOMÁTICAS
DO ESTADO DE SÃO PAULO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação **Stricto Sensu** Medicina e Bem Estar Animal da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária e Bem Estar Animal.

Orientador: Profa. Dra. Adriana Cortez

**São Paulo
2020**

Folha de Avaliação

Autor: Eduardo Alberto dos Reis

Título: Leptospirose canina em populações assintomáticas do estado de São Paulo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação **Stricto Sensu** Medicina e Bem Estar Animal da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária e Bem Estar Animal.

Data: ___/___/_____

Banca Examinadora

Prof.Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a Deus, por estar sempre comigo, me protegendo e me dando forças para as batalhas do dia a dia e assim ter chegado até aqui.

Aos meus pais que, ao longo da minha vida, me apoiaram em todas as minhas tomadas de decisões, e em especial, minha mãe, minha guerreira, minha luz, na qual tenho muito orgulho em ser seu filho.

Um agradecimento mais que especial a minha orientadora, Prof. Dra. Adriana Cortez, por ter acreditado em mim e ter proporcionado a realização desse sonho. Muito obrigado pelas broncas, pelos conselhos, pelo carinho e pelo apoio incondicional no momento mais difícil da minha vida.

Agradeço ao professor Marcos Bryan Heinemann por toda a ajuda para a realização desse trabalho, principalmente ao uso do laboratório. Agradeço também a Gisele e ao Antônio com o auxílio referente as amostras e aos resultados.

A todos os professores da Unisa, pela dedicação e ensinamento durante o período do mestrado. Agradecer aos amigos que fiz nessa jornada, e em especial a Roberta, minha parceira de mestrado na qual levarei para o resto da vida.

Em especial ao grande amor da minha vida, pela paciência, pelo apoio, pelo carinho, pois sem a sua ajuda nada disso teria acontecido....

RESUMO

A leptospirose é uma enfermidade infecto-contagiosa que pode acometer os animais e o homem. Possui distribuição mundial e é mais prevalente em regiões tropicais devido a características sócio-ambientais. Devido ao intenso convívio com o ser humano, os cães podem servir como sentinelas da contaminação ambiental. Esse trabalho teve como objetivo investigar a frequência de leptospirose canina em populações assintomáticas do Estado de São Paulo. Para isso foram analisadas através da técnica de soroaglutinação microscópica (SAM), 572 amostras provenientes de cães assintomáticos dos municípios de Apiaí, Cananeia, Itapeva e Itu por amostragem de conveniência. Em Apiaí, foram encontrados 40,5% dos animais reagentes para *Leptospiraspp.*, em Itapeva, 42,6% , em Cananeia 7,69% e em Itu, 5,05%. Em todos os municípios estudado foi possível encontrar pelo menos 1 animal com infecção ativa para os sorogrupos Canicola e/ou Icterohaemorrhagiae.

Palavras-chave: Leptospira. leptospirose. soroprevalência. Cães, sentinela.

ABSTRACT

Leptospirosis is an infectious disease that can affect animals and humans. It has worldwide distribution and is more prevalent in tropical regions due to socio-environmental characteristics. Due to intense contact with humans, dogs can serve as sentinels of environmental contamination. This study aimed to investigate the frequency of canine leptospirosis in vulnerable populations of the State of São Paulo. For this, were analyzed through the technique of microscopic agglutination SAM, 572 samples from dogs attended by castration campaigns and / or attended at CCZ for rabies vaccination of the municipalities of Apiaí, Cananeia, Itapeva and Itu. In Apiaí, 40.5% of the reactive animals were found for *Leptospira* spp., In Itapeva, 42.6%, in Cananeia 7.69% and in Itu, 5.05%.

Keywords: *Leptospira*. leptospirosis.seroprevalencia. Dog, sentinel.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição dos animais sororeagentes (vermelho) e não reagentes (verde) para leptospirose no município de Itapeva, São Paulo.....	30
Figura 2 - Distribuição dos animais sororeagentes e não reagentes para leptospirose no município de Cananeia, São Paulo.....	31
Figura 3 - Distribuição dos animais sororeagentes e não reagentes para leptospirose no município de Itu, São Paulo.....	32

LISTA DE QUADROS e TABELAS

Quadro 1 Quantidade de soros de cães analisados pela técnica de soroaglutinação microscópica (SAM) levando-se em conta o município, procedência, mês e ano de colheita.....	25
Quadro 2 Frequência absoluta de animais sororeagentes por município.....	28
Tabela 1- Frequência absoluta, relativa, moda e variação de títulos dos sorovares encontrados nos animais sororeagentes, independentemente de ser único ou coaglutinação no município de Apiaí, SP.....	29
Tabela 2 - Frequência absoluta, relativa, moda e variação de títulos dos sorovares encontrados nos animais sororeagentes, independentemente de ser único ou coaglutinação no município de Itapeva, SP.....	29
Tabela 3 - Frequência absoluta, relativa, moda e variação de títulos dos sorovares encontrados nos animais sororeagentes, independentemente de ser único ou coaglutinação no município de Cananeia, SP.....	30
Tabela 4 - Frequência absoluta, relativa, moda e variação de títulos dos sorovares encontrados nos animais sororeagentes, independentemente de ser único ou coaglutinação no município de Itu, SP.....	31

SUMÁRIO

1. Introdução	9
2. Revisão de Literatura.....	11
2.1. Etiologia.....	11
2.2. Aspectos Zoonóticos	12
2.3. Patogenia da infecção por Leptospirose canina	14
2.4. Apresentação Clínica da Infecção por <i>Leptospira</i> spp. em Cães	15
2.5. Cadeia Epidemiológica da Leptospirose Canina	17
2.6. Soroepidemiologia da leptospirose canina	18
2.7. Diagnóstico da infecção por <i>Leptospira</i> spp em cães	21
2.8. Tratamento, Controle e Prevenção da Infecção por <i>Leptospira</i> spp.....	22
2.9. Cães como Sentinelas para Doença Humana.....	23
3. Objetivos.....	24
3.1. Objetivo Geral	24
3.2. Objetivos Específicos.....	24
4. Materiais e Método	25
4.1. Caracterização das amostras	25
4.2. Técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM)	25
4.3. Georeferenciamento das amostras analisadas	26
4.4. Análise dos Dados	27
5. Resultados	28
6. Discussão.....	33
7. Conclusão.....	36
8. Referências Bibliográfica	37

1. Introdução

A leptospirose é uma das principais zoonoses e causa elevada morbidade e mortalidade em humanos. São estimados 1,03 milhões de casos (95% IC 0,43 a 1,75) por ano em todo o mundo, sendo a maior parte nas regiões tropicais. Para a região América Latina Tropical, representada majoritariamente pelo Brasil, estima-se 27.300 (9.000 - 53.200) casos anuais por cem mil habitantes, com morbidade de 13,53% (4,47 - 26,56) e mortalidade de 0,66% (0,23 - 1,28) com 1.300 (500 - 2.600) mortes (Costa et al 2015).

Em países tropicais e menos desenvolvidos contribuem, com aproximadamente 70% dos casos mundiais (Costa et al 2015), sendo a mortalidade variando entre 10 a 70% (McBride et al 2015). Este padrão é atribuído por fatores socioeconômicos, climáticos, ambientais e abundância de reservatórios que favorecem a sobrevivência de *Leptospira* spp., aumentando o risco de transmissão a humanos e animais (Ganoza et al 2006; Reis et al 2008). Apesar das enchentes, em áreas urbanas, ser um importante fator de risco da transmissão para a leptospirose humana, Costa et al (2015) identificaram fatores de risco associados a leptospirose rural agravados pela expansão da agricultura e desmatamento (DeFries et al 2010; Mwachui et al 2015) que favorece a exposição da população humana a novos reservatórios de *Leptospira* (Costa et al 2015). Além disso, os autores também identificaram que a leptospirose é um problema de saúde veterinária, com grandes impactos econômicos na produção animal (Costa et al 2015; Richtzenhain et al. 2002).

Além do impacto na saúde de animais vinculados a produção animal, cães podem ser acometido pela leptospirose e pode servir como um indicador ambiental. A técnica mais utilizada de detectar anticorpo anti-leptospira em cães é a soroaglutinação microscópica (SAM), técnica quantitativa que permite evidenciar o possível sorovar infectante. Por muitos anos, a SAM foi o teste que prevaleceu nos estudos de leptospirose canina no Brasil e no mundo, sobretudo em trabalhos epidemiológicos, visto que o isolamento da bactéria é difícil, demorado e de baixa sensibilidade. Com o avanço da biologia molecular, foram desenvolvidas técnicas para detectar o DNA da bactéria em diversas amostras biológicas, complementando a sorologia na pesquisa e diagnóstico da leptospirose canina. Mais recentemente, o sequenciamento de DNA, trouxe

uma nova forma de entender tanto o agente quanto a doença, desde sua classificação até a epidemiologia (Pinto et al. 2017).

A transmissão da bactéria, para os cães, ocorre principalmente por meio de contato com solo ou água contaminados com urina ou por contato direto do suscetível com cães infectados (Picardeau et al. 2013). Uma vez infectado, esse animal pode tornar-se portador crônico, excretando as leptospirosas na urina, colocando outros animais e humanos em risco (Miotto et al 2018a).

Os cães são hospedeiros acidentais para a maioria dos sorovares descritos, exceto para o sorovar Canicola, o qual, é considerado hospedeiro de manutenção (Schuller et al 2015). A doença no cão é, muitas vezes de evolução fatal, e pode ocorrer comprometimento renal e hepático (Hagiwara et al. 2004), mas muitos permanecem assintomáticos e excretam as bactérias na urina por um longo período (Miotto et al. 2016).

O controle da leptospirose nos animais se dá por medidas inespecíficas e específicas como tratamento dos portadores e imunização dos animais com vacinas inativadas que contenham os sorovares presentes no rebanho e ou região (Rodrigues et al 2011). Tradicionalmente, a imunoprofilaxia é uma das práticas de manejo mais relevantes para manter a sanidade animal e consequentemente para os seres humanos (Lee et al 2014), mas embora seja protetora contra a infecção letal, particularmente em animais, a imunidade induzida pela bacterina é considerada de curto prazo e restrita ao sorovar presente na vacina (Grassmann et al., 2017).

2. Revisão de Literatura

2.1. Etiologia

A leptospirose é uma enfermidade causada por bactérias do gênero *Leptospira*, da família Leptospiraceae, classe Spirochaetia que acomete diversas espécies de animais e o homem (Faine et al. 1999). Através da técnica de hibridização de DNA, a leptospira primeiramente foi classificada em 22 espécies, sendo 10 patogênicas, 5 intermediárias e 7 saprófitas contidas em 23 sorogrupos com mais de 300 sorovares (Adler; Moctezuma 2010a; Picardeau 2017). As espécies patogênicas são as que comumente causam doença clínica nos animais e no homem, as intermediárias causam sinais clínicos brandos e não tiveram sua virulência determinada em ensaios experimentais e as saprófitas somente são isoladas do ambiente (Picardeau 2017).

Mais recentemente, por meio da análise de sequenciamento total, o gênero *Leptospira* foi dividido em 64 espécies, classificada em dois grupos filogenéticos com quatro subgrupos, que são correlacionados com a virulência. Os dois clados são o “Saprófito” (S), formado por espécies isoladas do meio ambiente e sem relação com infecção em animais, o outro é o “Patogênico” (P), que contém as espécies responsáveis por infecção em animais e humanos mais as espécies isoladas do ambiente, mas que a virulência ainda não foi determinada. Dentro clado P existe o subclado P1 com as espécies patogênicas, o subclado P2 com as espécies ditas intermediárias e dentro do S, o S1 com as espécies saprófitas e o S2 com a espécie *L. idonii* (Vicent et al. 2019).

Sorologicamente as leptospirosas foram subdivididas em sorogrupos, levando em consideração a similaridade entre antígenos, e dentro dos sorogrupos, existem os sorovares classificados de acordo com a variedade antigênica dos lipopolissacarídeos de membrana, registrando-se 23 sorogrupos com mais de 300 sorovares (Adler; Moctezuma 2010a). Os sorovares são definidos pela aglutinação após a adsorção cruzada da bactéria isolada com antissoro produzido com antígenos heterólogos (Levett 2015).

Os sorovares são utilizados no diagnóstico sorológico auxiliando diagnóstico, formulação de novas vacinas com os sorovares mais prevalente e determinando as fontes de infecção (Levett 2015).

Morfologicamente, as leptospiras são longas, delgadas, espiraladas, medindo aproximadamente 0,1 µm de diâmetro e 6 a 20 µm de comprimento. À microscopia de campo escuro, apresentam-se na forma de ganchos que se formam em uma ou ambas as extremidades da bactéria, diferenciando-as de outras espiroquetas. É móvel, apresentando movimentos rotacionais, devido à presença de dois endoflagelos em sua estrutura. Apesar de não serem coradas pelo método de Gram, possuem membrana de lipopolissacarídeos semelhante à de bactérias Gram negativas (Faine et al. 1999; Levett 2001). Quanto ao metabolismo, são aeróbias ou microaeróbica e exigentes em termos nutricionais, geralmente, necessitando de ácidos graxos de cadeia longa como fonte de carbono. Apresentam um crescimento ótimo à temperatura de 28 a 30°C. Eventualmente, as espécies patogênicas podem crescer a 37°C, mas não a temperaturas baixas, já as saprófitas podem crescer a 14°C e em pH próximo da neutralidade (7,2 - 7,6). As espécies saprófitas conseguem sintetizar purinas e pirimidinas e são capazes de crescer na presença de 8-azaguanine, o que diferencia entre saprófitas e patogênicas (Cameron 2015).

2.2. Aspectos Zoonóticos

A infecção por *Leptospira* spp. pode ocorrer naturalmente no homem sendo, deste modo, considerada uma doença zoonótica (Acha, Szyfres 1989).

A leptospirose é uma das principais zoonoses e causa grande morbidade e mortalidade, sendo estimado 1,03 milhões de casos (95% IC 0,43 a 1,75) por ano em todo o mundo, com a maioria dos casos acontecendo nas regiões tropicais. Para a região América Latina Tropical, representada majoritariamente pelo Brasil, estima-se 27.300 (9.000 - 53.200) casos anuais por cem mil habitantes com morbidade de 13,53% (4,47 - 26,56), mortalidade de 0,66% (0,23 - 1,28) com 1.300 (500 - 2.600) mortes (Costa et al 2015).

Este padrão é atribuído por fatores socioeconômicos, climáticos, ambientais e abundância de reservatórios que favorecem a sobrevivência de *Leptospira* spp., aumentando o risco de transmissão a humanos e animais (Ganoza et al 2006; Reis et al 2008). Apesar das enchentes, em áreas urbanas, ser um importante fator de risco da transmissão para a leptospirose humana, Costa et al (2015) identificaram fatores de risco associados a leptospirose rural agravados pela expansão da agricultura e desmatamento (DeFries et al 2010; Mwachui et al 2015) que favorece a exposição da população humana a novos reservatórios de *Leptospira* (Costa et al 2015). Além disso, os autores também identificaram que a leptospirose é um problema de saúde veterinária, com grandes impactos econômicos na produção animal (Costa et al 2015; Richtzenhain et al. 2002).

A infecção humana ocorre, sobretudo, pelo contato com água ou solo (lama) contaminados com a bactéria, principalmente, em enchentes, durante a qual, o *Rattus norvegicus* (ratazana ou rato de esgoto), hospedeiro de manutenção dos sorovares Copenhageni e Icterohaemorrhagiae (Sakata et al. 1992) são desalojados. Por isso, a maioria das infecções humanas no Brasil e no mundo dá-se por esses sorovares, ambos pertencentes ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae (Acha, Szyfres 1989; Guernier et al 2016; Pagès et al 2016), mas há relatos da infecção de humanos por contato com águas de recreação (Abb 2002; Grobusch et al 2003; Pagès et al. 2016). O homem, ainda, pode infectar-se ainda por outros sorovares, como Canicola (Sakata et al. 1992).

A leptospirose pode ser considerada uma doença ocupacional principalmente para veterinários, fazendeiros, mineiros, magarefes e trabalhadores que atuam na manutenção de redes sanitárias (Levet 2001; Yupiana et al. 2019).

A infecção, no homem, tem período de incubação entre 2 a 20 dias, em média de 5 a 14 dias e é caracterizada por ser bifásica. A fase precoce ou septicêmica é marcada por dor de cabeça, calafrios, febre ($> 39^{\circ}\text{C}$), dor no peito tosse, faringite que perdura por 4 a 9 dias. A fase tardia ou imune ocorre entre o 6^o ao 12^o dia e é correlacionada com o aparecimento de anticorpos anti-*Leptospira*. A síndrome de Weil, também conhecida por leptospirose

ictérica, é uma forma severa da doença que acomete os seres humanos que podem apresentar icterícia, azotemia, anemia, febre e hemorragias. Disfunções renais e hepática podem aparecer entre o 3 ao 6º dia. A mortalidade é entre 5 a 10%. O tratamento deve ser realizado com antibióticos como a Penicilina e Doxiciclina(Brasil 2010).

O diagnóstico da leptospirose humana pode ser realizado pela SAM. Títulos maiores que 800 em pacientes com sintoma clássico ou aumento de título de 4 x (soroconversão) em amostras pareadas são considerados suficientes para a confirmação do diagnóstico, entre os métodos diretos está a reação em cadeia pela polimerase (PCR) (Brasil 2010).

2.3. Patogenia da infecção por Leptospirose canina

A patogenia da infecção por *Leptospira* spp. é variável e depende de fatores como virulência da estirpe, sorovariedade, do *status* imune do hospedeiro (exposição prévia ou vacinação) (Goldstein 2010).

A porta de entrada da leptospira, no animal, dá-se através das mucosas oral, nasal, ocular ou pela pele danificada (arranhada, cortes, abrasada) ou pela pele enrugada pela água. A fase de bacteremia (leptospiremia) é de aproximadamente 7 dias. O primeiro sítio de multiplicação da bactéria é o endotélio vascular, seguida de disseminação para os vários tecidos como rins, fígado, baço, sistema nervoso central, sistema reprodutivo, olhos. Nestes órgãos, ocorre multiplicação, principalmente nos endotélios ocasionando isquemia localizada com consequente necrose de túbulos renais e de hepatócitos. Pode-se observar hemorragia, coagulação disseminada intravascular(CID) e falha renal, icterícia, hemorragias e edema pulmonar, podendo levar o animal a morte (Goldstein 2010; Greene et al. 2012).

Com o aumento dos níveis de anticorpos, que se dá aproximadamente a partir do nono dia, o animal começa a eliminar as leptospiras do sangue e da maioria dos órgãos, mas as bactérias conseguem colonizar os rins e podem ser excretadas na urina por um longo período de tempo. Para os sorovares Canicola e Pomona, a excreção pode chegar a meses. Em cães que se

recuperaram sem tratamento, com antibióticos, há a maior possibilidade de se tornarem portadores (Greene et al. 2012).

Na infecção experimental, a colonização renal ocorre na maioria dos casos. As bactérias persistem e multiplicam-se no epitélio dos túbulos renais, mesmo na presença de anticorpos neutralizantes. As células produzem citocinas e resposta inflamatória podendo acarretar numa nefrite aguda. O comprometimento agudo da função renal pode resultar na diminuição da filtração glomerular devido ao edema renal que prejudica a perfusão sanguínea renal. Isto acontece, principalmente, em infecções por *Canicola*, onde o cão é o hospedeiro primário. A nefrite intersticial é uma manifestação crônica da doença nos cães (Goldstein 2010). A capacidade das leptospiros se manterem ativas nos rins, provavelmente, é explicada pela ausência de complemento no interstício renal (Greene et al. 2012). No fígado, a infecção principalmente por *Icterohaemorrhagiae* ou *Copenhageni* causam icterícia por necrose centrolobular e oclusão dos dutos biliares (Goldstein 2010)

Nos animais, com títulos de anticorpos moderados, teremos uma leptospiremia curta e sinais clínicos leves ou o animal poderá permanecer assintomático, já para os cães com títulos altos, a infecção será debelada e não serão observados sinais clínicos e o animal dificilmente se tornará um portador (Greene et al. 2012).

2.4. Apresentação Clínica da Infecção por *Leptospira* spp. em Cães

A apresentação da leptospirose em cães pode ser inaparente até manifestar-se como doença severa, com comprometimento renal e/ou pulmonar (Goldstein 2010; Miotto et al 2016). Adler, Moctezuma (2010b), em estudo com animais sadios, referem que 6,9% dos cães estavam excretando bactérias na urina, além disso, animais que se recuperam da doença podem tornar-se portadores e continuar excretando leptospiros pela urina (Vasconcellos 1993).

Quatro síndromes em cães foram relacionadas a infecção por leptospira: i. icterica, ii. hemorrágica, iii. urêmica (doença de Stuttgart) e iv. reprodutiva (abortamentos e nascimentos de filhotes fracos) (Adler, Moctezuma 2010a).

Os sinais clínicos mais comuns observados são letargia, anorexia, dor abdominal, febre, icterícia, vômitos, diarreia, dor muscular, CID (coagulação intravascular disseminada), uremia por falha renal, hemorragias e morte. Angústia respiratória associada a hemorragia pulmonar pode ser relatada na necropsia. Quando ocorre síndrome urêmica, pode-se observar vômitos, polidipsia, oligúria, halitose associada a úlceras orais (Lunn 2019).

Não há mudanças patognomônicas no perfil do hemograma, leucograma e perfil bioquímico dos cães infectados (Goldstein 2010), mas os resultados da patologia clínica auxiliam o clínico a tomar decisões frente aos casos. As alterações mais comuns observadas no hemograma e leucograma são: leucocitose por neutrofilia, linfopenia, monocitoses, trombocitopenia (de leve a moderada) e anemia suave. Na análise bioquímica pode ocorrer aumento dos níveis séricos de ureia e creatinina e das enzimas hepáticas ALT e FA (fosfatase alcalina). Proteinúria, glicosúria, bilirrubinúria, cilindúria, hematúria e piúriapodem ser mencionadas na urinálise (Lunn 2019).

A doença caracterizada por síndrome hepática e renal está associada aos sorovares *Icterohaemorrhagiae* e *Copenhageni*. É uma síndrome de curso agudo, que normalmente resulta em morte. Os sinais mais comuns são icterícia, febre, mialgia, prostração, alteração renal, podendo evoluir para insuficiência renal e uremia (Hagiwara 2003). O sorovar *Pomona* também está associado a doença hepática (Weese, Fulford 2011).

O sorovar *Icterohaemorrhagiae* está relacionado com a síndrome hemorrágica pulmonar, onde o animal apresenta tosse e dispneia, indicativo de comprometimento pulmonar, associadas à pneumonia intersticial e hemorragia pulmonar com consolidação alveolar. No Brasil, essa síndrome já foi relatada e foi observada taquipneia, dispneia, edema pulmonar, pneumonia e na necropsia, hemorragia pulmonar multifocal (Silva et al 2017).

A leptospirose canina causada pelo sorovar *Canicola* normalmente é anictérica e sinais gastroentéricos são mais frequentes. A infecção por

Canicola foi denominada de doença de Stuttgart e caracteriza-se por comprometimento renal, a evolução é mais lenta, e pode resultar em nefrite intersticial crônica (Rentko et al. 1992). Os principais sinais são perda de peso, poliúria, desidratação, diarreia, vômitos, úlceras na cavidade oral e língua (Hagiwara 2003). O sorovar Bratislava e Grippotyphosa também podem estar associados a doença renal (Weese, Fulford 2011).

Os sorovares que podem infectar os cães são: Icterohaemorrhagiae, Canicola, Pomona, Autumnalis, Grippotyphosa, Pyrogenes, Copenhageni, Bratislava, Bataviae, Hardjo(Levett 2011; Schuller et al 2015; Miotto et al 2018).

2.5. Cadeia Epidemiológica da Leptospirose Canina

O cão é o hospedeiro primário ou de manutenção dos sorovares Canicola e Bataviae, sendo hospedeiro acidental dos sorovares Bratislava, Autumnalis, Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Pomona, Hardjo, Australis e Grippotyphosa. Os sorovares Icterohaemorrhagiae, Copenhageni estão associados aos ratos, consequentemente cães expostos a enchentes e com contato com roedores tem maior chance de se infectarem por estes sorovares. O sorovar Grippotyphosa está relacionado a animais silvestre, como o gambá, portanto, cães na zona rural tem maior probabilidade de se infectarem com esta sorovariedade (Goldstein 2010; Greene et al. 2012). Deste modo, a infecção do cão por diferentes sorovares será determinado pela vinculação de reservatórios existentes no meio em que o animal vive (Hagiwara 2003).

No Brasil, os sorovares mais relatados são o Icterohaemorrhagiae, Copenhageni e Canicola (Hagiwara et al. 2003; Brod et 2005).

A principal fonte de infecção para os cães são os próprios cães portadores que excretam a *Leptospiraspp.* pela urina, especialmente o sorovar Canicola (Azocar-Aedo et al 2015). Os cães de regiões urbanas que sofrem com enchentes têm maior probabilidade de se infectarem com sorovar Copenhageni, cujo hospedeiro de manutenção é o *Rattus norvegicus*(Faria et al 2008; Willian 2014).

A via de eliminação da *Leptospira spp* pela fonte de infecção é por meio da urina contaminada com as bactérias, a eliminação é intermitente e pode

durar de dias a meses, dependendo da sorovariedade infectante (Willian 2014). Entre os animais, os ratos excretam a maior quantidade de *Leptospira* por mL/urina (média $5,7 \times 10^6$; min- max $5 - 8 \times 10^8$ bactérias/mL), seguido pelos bovinos $3,7 \times 10^4$ ($3 \times 10^2 - 3,7 \times 10^4$ mL/urina), camundongos $3,1 \times 10^3$ ($4,7 \times 10^2 - 1,8 \times 10^6$ mL/urina), humanos $7,9 \times 10^2$ ($3,2 \times 10^1 - 8,5 \times 10^6$ mL/urina) e cães $1,4 \times 10^2$ ($3,5 \times 10^1 - 1,3 \times 10^6$ mL/urina) (Barragan et al 2017).

A transmissão se dá por contato direto com a urina contaminada ou de forma indireta pelo contato com água, solo/lama contaminados com a bactéria. A porta de entrada são as mucosas (oral, conjuntiva) e a pele íntegra, mas exposta por um longo período de exposição a água, e/ou lesada por arranhaduras, abrasão etc. Os susceptíveis são todos os mamíferos, neste caso o cão não imunizado (Goldstein 2010; Greene et al. 2012).

2.6. Soroepidemiologia da leptospirose canina

A leptospirose canina foi primeiramente identificada em 1850, na cidade de Stuttgart na Alemanha por Hofer, passando a ser conhecida como Doença de Stuttgart. Em 1913, Fairise e Thiry conseguiram cultivar espiroquetas de um surto da doença em cães de caça e em 1916, pesquisadores identificaram a possibilidade do cão ser portador da bactéria para o homem (Enrietti 2001). No Brasil, o primeiro registro foi em 1940, feito por Dacorso Filho, que isolou o sorovar *Icterohaemorrhagiae* de um cão e depois, em 1945, Azevedo e Santos isolaram o sorovar *Canicola* (Enrietti 2001).

A leptospirose canina tem distribuição mundial, com maior prevalência em países tropicais (Costa et al 2015), sendo considerada uma enfermidade sazonal, mas com dependência regional e surtos relacionados com chuvas fortes e enchentes (Lee et al 2014; Schuller et al 2015). Em um estudo na Suíça, foi demonstrado uma correlação entre casos de leptospirose canina e aumento da temperatura e quantidade de chuva (Major et al 2014). Outros fatores de risco são viver próximo a coleção de água, nadar em rios, lagos ou beber água não tratada ou ter contato com a vida selvagem. Os animais que vivem em abrigos têm maior risco que a população geral (Schuller et al 2015). Nos Estados Unidos, machos, cães de rebanho, de caça, de trabalho tem

maior risco, mas sexo ou raça não foi identificado como fator de risco (Schuller et al 2015). Em outro estudo nos EUA, foi observada uma soroprevalência de 8,1% (IC 95 7,8-8,4%) para *Leptospira* spp., sendo os sorovares mais prevalentes Autumnalis, Grippotyphosa, Pomona e Bratislava (Gautam et al. 2010). Nos EUA, também foi determinado que a localização, áreas suburbanas ou com floresta decídua, e clima (precipitação e temperatura) são preditores para resultado positivo na SAM (White et al. 2017).

Em Berlim, na Alemanha, estudo com 329 cães com sinais de doença renal ou hepática, a soroprevalência foi de 32% e o sorogrupo predominante foi Australis (24%), seguido por Grippotyphosa (20%) e Pomona (9%), sendo que 18% possuíam o critério de inclusão para infecção ativa (sinais clínicos mais título > 800 ou PCR positiva). Na década de 1950 os sorovares os mais prevalentes eram Canicola e Icterohaemorrhagiae, em 2000 Grippotyphosa, em 2007 Grippotyphosa e Serjoe e, em 2013, os sorovares Australis, Grippotyphosa e Pomona. Uma explicação é a intensa vacinação para Canicola e Icterohaemorrhagiae e a contaminação ambiental por animais selvagens, por exemplo roedores silvestres (Bratislava, Grippotyphosa) e javali (Pomona) (Mayer-Scholl et al. 2013). Na França, os resultados indicam a circulação de *Leptospira* pertencente aos sorogrupos Australis e Grippotyphosa (Renaud et al 2013).

Num estudo na ilha de Trinidad e Tobago, 15,7% (207) dos cães de rua, 72% (50) dos cães suspeito de leptospirose e 16,5% (200) de ratoese apresentaram-se reagentes para leptospira, sendo o sorogrupo mais frequente o Icterohaemorrhagiae, sorovar Copenhageni (Suepul et al 2014).

Em uma revisão sistemática sobre leptospirose em cães, na América Latina, a soroprevalência por animal foi de 4,9 a 72,0%, com uma mediana de 20,1%. O sorogrupo predominante foi o Canicola (35,5% dos artigos), seguido por Icterohaemorrhagiae (17,8%), Pyrogenes (8,9%), Autumnalis (8,9%), Cynopteri ou Castellonis (4,4%), Pomona, Shermani, Grippotyphosa, Sensot (2,2%). A explicação para o sorogrupo Pyrogenes ser o terceiro colocado é que pode representar reação cruzada com o sorogrupo Icterohaemorrhagiae (Pinto et al. 2017).

Na região Sul do Brasil, foi observada a associação de chuva e soropositividade para *Leptospira* nos animais, sendo o Canicola (sorogrupo Canicola) amostra Tande (27,96%), Kito (22,60%), e Hond Utrecht IV (18,34%) as mais prevalentes, seguida por Copenhageni (sorogrupo Icterohaemorrhagiae) (12,75%), Ballum (sorogrupo Ballum) (9,84%) e Butembo (sorogrupo Autumnalis) (8,50%). Foi relatada também correlação positiva entre soropositividade entre cães e humanos (Jorege et al. 2017).

Ainda na região Sul do Brasil, em Maringá PR, a soroprevalência em cães foi de 12,2%, sendo os sorovares mais frequentes Pyrogenes (43,9%), Canícola (21,9%) e Copenhageni (19,5%) e nos humanos, a positividade foi de 2 (8%) para os sorovares, Pyrogenes e HardjoPrajitno, Pyrogenes e Cynopteri (Fonzar e Langoni 2012). Outros estudos, no Brasil, também indicam que para cães os sorovares mais prevalentes são Canicola, Icterohaemorrhagiae e Copenhageni (Vasconcellos et al. 1997; Favero et al. 2001; Favero et al. 2002).

Estudo em humanos na cidade de Salvador BA, observou-se que a soropositividade está associada a baixa escolaridade e a diferenças socioeconômicas, e que enchentes estão relacionados a surtos de leptospirose além disso homens com mais de 15 anos tem até 2,2 vezes chance de se infectar. A prevalência maior foi para o sorogrupo Icterohaemorrhagiae, mas observaram altos títulos para o sorogrupo Canicola (Dias et al 2007; Reis et al. 2008).

Na cidade de São Paulo, SP, de 20 cães com sintomatologia clínica compatível para leptospirose foi possível isolar a bactéria de 4, sendo uma caracterizada como sorovar Icterohaemorrhagiae e duas como Canicola e uma indeterminada (Rodrigues et al. 2007). Em uma população de cães mantida em abrigos em Mogi das Cruzes, SP, foi encontrado 1 animal com leptospirose, mas nenhum cão apresentava títulos na SAM. Em outro abrigo, localizado na cidade de São Paulo, 10 (10,9%) cães apresentavam leptospirose e 51% apresentavam títulos que variavam de 100 a 12.800, sendo que os sorogrupos mais prevalentes foram sorogrupo Autumnalis (43), Icterohaemorrhagiae (34), Pomona (20) e Pyrogenes (14). No mesmo estudo, mas com uma população de cães de rua da Cidade Universitária (campus USP Butantã, SP, SP), de 7 cães examinados, dois excretavam *Leptospira* spp. na urina, e na SAM os

sorogrupos mais prevalentes foram Grippotyphosa (4), Autumnalis (2). Pela caracterização molecular, uma das amostras foi identificada como *L. interrogans* sorovar Canicola e outra como *L. santarosai* (Miotto et al 2018c), mostrando a diversidade de possibilidades de infecção dos cães. Num estudo semelhante, realizado em Porto Alegre, com cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRS), cães do Centro de Controle de Zoonose (CCZ) e de rua do bairro Arquipélago, 37(253) cães apresentavam leptospirúria, sendo que 7,7% pertenciam ao CCZ, 14,8% ao Arquipélago e 27,3% ao Hospital Veterinário, ressalta-se que os animais do hospital tinham suspeita de leptospirose. Na SAM, 48,8% dos cães apresentaram títulos, mas apenas 34,4% foram positivos na PCR (urina ou sangue). Os sorovares mais prevalente foram Canicola, Icterohaemorrhagiae e Copenhageni. Foi determinado que cães com PCR positivo na urina tinham associação positiva com a presença de ratos (Oliveira 2010).

Na cidade de Botucatu, SP, um estudo com 106 cães clinicamente saudáveis encontrou uma soropositividade de 5.7% (IC 95% 2.2 - 10%), sendo os sorogrupos mais prováveis Canicola (66.6%), Autumnalis (33.3%) e Grippotyphosa (16.6%). Apenas 1 animal foi positivo na PCR. Outro estudo demonstrou uma frequência maior, variando entre 7-32% de soropositivos (Latosinski et al 2018).

Numa região endêmica para leptospirose, na cidade de Curitiba, um estudo de coorte resultou numa soroprevalência de 9,3 (95% IC 6,7-12,6) a 19% (95% IC 14,1-25,2), com uma incidência de 11%. Os sorogrupos mais frequentes foram Canicola e Icterohaemorrhagiae. Como conclusão não foi observado aumento na soroprevalência, durante o estudo e uma explicação aventada é o decaimento de anticorpos em 3 meses detectados pela SAM (Morikawa et al 2015).

2.7. Diagnóstico da infecção por *Leptospira* spp em cães

O diagnóstico da infecção por *Leptospira* spp em cães pode ser feito de modo direto, onde será observado o agente ou o DNA ou por métodos indiretos, onde observa-se a presença de anticorpos anti-*Leptospira*.

O exame direto, por meio de microscopia de campo escuro pode ser feito em sangue ou na urina. É um teste rápido, mas de baixa sensibilidade; devido a esta limitação não é utilizado na rotina diagnóstica (Reagen, Sykes 2019).

O cultivo do agente e a identificação é atécnica considerada “padrão ouro”, mas também é um método pouco sensível (em torno de 10%) e demorado pois só após 60 dias de crescimento em meio de cultura é que a amostra poderá ser considerada negativa. Os espécimes clínicos para o cultivo são o sangue, na fase aguda ou urina, na fase crônica. No caso de óbitos, pode-se utilizar fígado, rim, pulmão e urina (Reagen, Sykes 2019).

Dentre os métodos diretos, ainda podem ser utilizadas a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) ou em tempo real (qPCR) que são provas de eleição para a rotina de diagnóstica, pois tem alta sensibilidade (99%) e especificidade diagnóstica e analítica (Mito et al. 2018a,b).

Entre os métodos indiretos, a técnica de referência para o diagnóstico é a Soroaglutinação Microscópica (SAM). A SAM permite a diferenciação em sorogrupos e sorovares, sendo indicada, principalmente, para detecção de sorogrupo e é a prova mais utilizada na rotina diagnóstica. Para o animal ser considerado com infecção ativa, o ideal é que sejam colhidas duas amostras de sangue (soro) com intervalo de 7 a 14 dias e se observa um aumento do título de 4 ou mais vezes. Em estudos epidemiológicos o ponto de corte utilizado é 100, mas indivíduos com títulos igual ou maior que 800 associados a sinais clínicos são compatíveis com infecção ativa (Mayer-Scholl et al. 2013). Animais vacinados normalmente não produzem títulos altos (<400) e estes decaem em 4 meses pós-vacinação (Reagen, Sykes 2019).

O valor preditivo de uma única amostra é melhor quando há associação com sinais clínicos compatíveis com leptospirose. A sensibilidade diagnóstica aumenta quando ocorre a associação de métodos, como a SAM e PCR. Em casos clínicos, recomenda-se a utilização da PCR em sangue e urina e a sorologia pareada (Reagen, Sykes 2019).

2.8. Tratamento, Controle e Prevenção da Infecção por *Leptospira* spp.

O tratamento de suporte utilizado para animais com leptospirose irá depender da severidade das lesões renais e hepáticas e de outras complicações. A antibioticoterapia deve ser iniciada o mais rápido possível, pois reduz a febre, a leptospiremia, a multiplicação das bactérias e também possíveis falhas renais e ou hepáticas. A penicilina e seus derivados são os antibióticos de eleição para interromper a leptospiremia (Greene et al 2012).

O Consenso Europeu para Leptospirose Canina recomenda que a leptospirose deve ser tratada com 5 mg / kg a cada 12 horas ou 10 mg / kg a cada 24 horas de doxiciclina por 14 dias. Cães com sinais gastrointestinais, inicialmente, devem ser tratados com um derivado da penicilina iv (por exemplo, 20-30 mg / kg q6-8h ampicilina, 25.000-40.000 U / kg q6-8h penicilina G ou 20-30 mg / kg q6-8h amoxicilina). É importante que o cão receba a dosificação de doxiciclina oral por 14 dias para eliminar a colonização renal (Schuller et al 2015).

A vacinação é o método tradicional utilizado para a prevenção da leptospirose canina, mas ela induz imunidade específica ao sorogrupo utilizado na vacina, mas não aos heterólogos (Schuller et al 2015), por isso é de fundamental importância conhecer os sorovares/sorogrupos circulantes na região. Em um estudo sobre vacinação, ficou demonstrado que cães revacinados com bacterina produzida com o sorovar Icterohaemorrhagiae não apresentaram aumento do título de anticorpos inibidores do crescimento contra o sorovar Copenhageni, em nível suficiente para inibir o crescimento de leptospiras (Rodrigues et al 2013).

Os animais primovacinados devem receber, a partir de 9 semanas de idade, duas doses com intervalo de 3 a 4 semanas e ser revacinados anualmente, pois aparentemente a duração da imunidade é de 12 meses, mas cães que não se vacinaram por mais de 18 meses, devem receber o esquema da primovacinação. Os animais estão protegidos a partir de 3 semanas após a última dose (Greene et al 2012; Shuller et al 2015).

Outras medidas de prevenção incluem a diminuição ou limitação do acesso às fontes de água ao ar livre, a exposição à vida selvagem e o controle de roedores (Greene et al 2012; Shuller et al 2015).

2.9. Cães como Sentinelas para Doença Humana

Os animais sentinelas são aqueles que por refletirem as perturbações do meio ambiente podem servir de indicadores da conservação do mesmo. Estes animais podem ser utilizados em levantamentos transversais rápidos para avaliar o impacto ambiental ou em vigilância a longo prazo para avaliar e acompanhar as condições ambientais (Nava 2008). O sistema sentinela consiste na monitoração de uma população alvo e com sinais específicos utilizados como um alerta precoce, sendo que cada doença possui sua variação e características epidemiológicas e patogênicas, variando em cada sorotipo ou espécie acometida. Animais sentinelas devem ser capazes de desenvolver uma resposta adequada e detectável a um patógeno, para se ter uma rápida e precisa visualização do que está acontecendo ao ecossistema (Guimarães 2015).

Os cães são bons sentinelas para detectar a presença de leptospiras em ambiente com grande adensamento populacional, porque eles estão mais expostos aos fatores de riscos e as contaminações ambientais (Jorge et al 2017), além disso o cão como predador pode ingerir caças (ratos) que podem estar infectados e, deste modo, ter contato com a *Leptospira*. A vigilância nos cães também é importante pois eles podem alertar para a introdução de um novo sorovar (Blazius et al 2005; Bier et al 2013).

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo foi investigar a frequência de leptospirose canina em populações caninas assintomáticas no Estado de São Paulo.

3.2. Objetivos Específicos

3.2.1 Verificar a ocorrência de animais assintomáticos com infecção ativa para leptospirose

3.2.2 Estabelecer os sorogrupos mais prováveis entre os animais sororeagentes

4. Materiais e Método

4.1. Caracterização das amostras

Foram utilizadas 572 amostras de banco de soro provenientes de animais saudáveis de campanhas de castração ou de atendimento para avaliação pré cirúrgica para a castração nos municípios de Itapeva, Apiaí, Cananeia, Itu (CEUA UNISA 35/2012, 19 /2014, 28.1/2016), (Quadro 1, fig 1).

Quadro 1- Quantidade de soros de cães analisados pela técnica de soroaglutinação microscópica (SAM) levando-se em conta o município, procedência, mês e ano de colheita.

Município	Quantidade	Origem	Mês de colheita	Ano de colheita
Itapeva	202	Campanha de Castração	Junho/Julho	2014-2015
Apiaí	41	Campanha de Castração	Julho	2016
Cananeia	52	Campanha de Castração	Julho	2016
Itu	277	Avaliação pré cirúrgica	Março a Novembro	2016

4.2. Técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM)

As amostras foram processadas no Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Para pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira* spp. empregou – se o teste de soroaglutinação microscópica (SAM) (Galton et al., 1965; Cole et al., 1973) aplicando- se uma coleção com 24 variante sorológicas de antígenos vivos, entre amostras de referência e estirpes autóctones isoladas no Brasil.

A triagem dos soros foi realizada com os 24 antígenos (Castellonis, Hardjo-Prajitno, Hardjobovis, Javanica, Tarassovi, Whitcombi, Australis, Autumnalis, Bataviae, Bratislava, Canicola, Copenhageni, Hebdomadis, Pomona, Pomona (GR6), Pyrogenes, Icterohaemorrhagiae, Sentot, Grippotyphosa, Butembo, Cynopteri, Panama, Shermani, Guaricura) e aqueles que apresentaram título igual 100 foram submetidos a titulação com os antígenos reagentes utilizando diluição geométrica seriada com base 2. O título final foi a recíproca da última diluição que gerou aglutinação. Foi considerado o sorovar mais provável o que apresentou a maior titulação na maior frequência. Animais com sorovares com títulos iguais foram considerados sororeagentes para leptospira, mas os sorovares foram desconsiderados (Fávero et al., 2002).

Para efeito de análise, animais com título igual ou acima de 800 foram considerados com infecção ativa.

4.3. Georeferenciamento das amostras analisadas

Para realizar o georeferenciamento, as coordenadas geográficas das casas onde os animais vivem foram obtidas através do endereço fornecido pelo proprietário ao preencher o termo de consentimento livre e esclarecido. Através do endereço fornecido foi localizada a longitude e a latitude de cada casa onde vive os animais, utilizando o sistema de posicionamento global (Global Positioning System – GPS) e mapccordinates.net, serviço da *Vivid Planet Software GmbH*.

Foi utilizado o programa QGIS versão 2.18 para a realização da plotagem dos resultados obtidos dos animais (reagentes e não reagentes) em cada cidade analisada.

4.4. Análise dos Dados

Foi realizada uma análise descritiva

5. Resultados

Foram analisados 572 soros para *Leptospira* spp., desses 121 (21,15%) foram reagentes para pelo menos uma variante sorológica pesquisada. No quadro 2 estão sumariados os resultados encontrados por município.

Quadro 2- Frequência absoluta de animais sororeagentes por município.

Município	Animais		Total
	Sororeagentes	Não reagentes	
Apiaí	17	24	41
Cananeia	4	48	52
Itapeva	86	116	202
Itu	14	263	277
Total	121	451	572

Em Apiaí, foram encontrados 40,5% dos animais reagentes para *Leptospira* spp., sendo que o sorovar mais frequente, independentemente de ser único ou não, foi o Canicola, com moda de 1600, seguido do Castellonis (Tabela 1). O sorovar mais provável foi o Canicola (14/16). Sete animais apresentaram título igual ou maior que 800 para o sorovar Canicola e um para o sorovar Copenhageni.

No município de Itapeva, pode-se observar que 42, 6% dos animais foram sororeagentes para *Leptospira* spp. com a predominância do sorovar Copenhageni (29,07%), apresentando variação de títulos entre 100 e 12800, seguido do sorovar Icterohaemorrhagiae (20,54%) (Tabela 2). O sorovar mais provável foi o Copenhageni (48/73), seguido pelo Cynopteri (7/73). Trinta e três animais tiveram títulos iguais ou maiores que 800, sendo 79% para o sorovar Copenhageni, 9% para Canicola, 6% para Cynopteri, e 3% para os sorovares Icterohaemorrhagiae e Castellonis.

Os municípios de Cananeia e Itu foram os de menor ocorrência de animais sororeagentes para *Leptospira* spp. sendo 7,69% e 5,05% respectivamente (Tabelas 3 e 4). Em Itu, um animal apresentou título de 800 para Icterohaemorrhagiae e em Cananeia, um para Copenhageni.

A distribuição espacial dos animais sororeagentes e não reagentes nos municípios de Itapeva, Cananeia e Itu por município pode ser evidenciada nas figuras 1, 2, 3, respectivamente.

Tabela 1- Frequência absoluta, relativa, moda e variação de títulos dos sorovares encontrados nos animais sororeagentes, independentemente de ser único ou coaglutinação no município de Apiaí, SP.

Sorovar	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)	Título (variação)	Moda
Bratislava	1	3,22	100	100
Castellonis	9	29,04	100-400	400
Canicola	14	45,16	100-2500	1600
Copenhageni	1	3,23	800	800
Pyrogenes	6	19,35	100-400	200
Total	31	100		

Tabela 2 - Frequência absoluta, relativa, moda e variação de títulos dos sorovares encontrados nos animais sororeagentes, independentemente de ser único ou coaglutinação no município de Itapeva, SP.

Sorovar	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)	Título (variação)	Moda
Australis	18	6,98	100-800	200
Bratislava	1	0,39	100	100
Autumnalis	6	2,32	200-800	200
Butembo	1	0,39	400	400
Castellonis	9	3,49	100-1600	200 e 400
Canicola	35	13,56	100-25600	200
Cynopteri	37	14,34	100-6400	200
Hebdomadis	2	0,77	100-1600	100 e 1600
Copenhageni	75	29,07	100-12800	400
Icterohaemorrhagiae	53	20,54	100-1600	200
Panama	1	0,39	400	400
Pomona	2	0,77	200	200
Pyrogenes	13	5,04	100-800	100 e 200
Wolffi	3	1,16	100-400	100, 200 e 400
Andamane	2	0,77	100-400	100 e 400
Total	258	100		

Figura 1 -Distribuição dos cães sororeagentes (vermelho) e não reagentes (verde) para leptospirose no município de Itapeva, São Paulo.

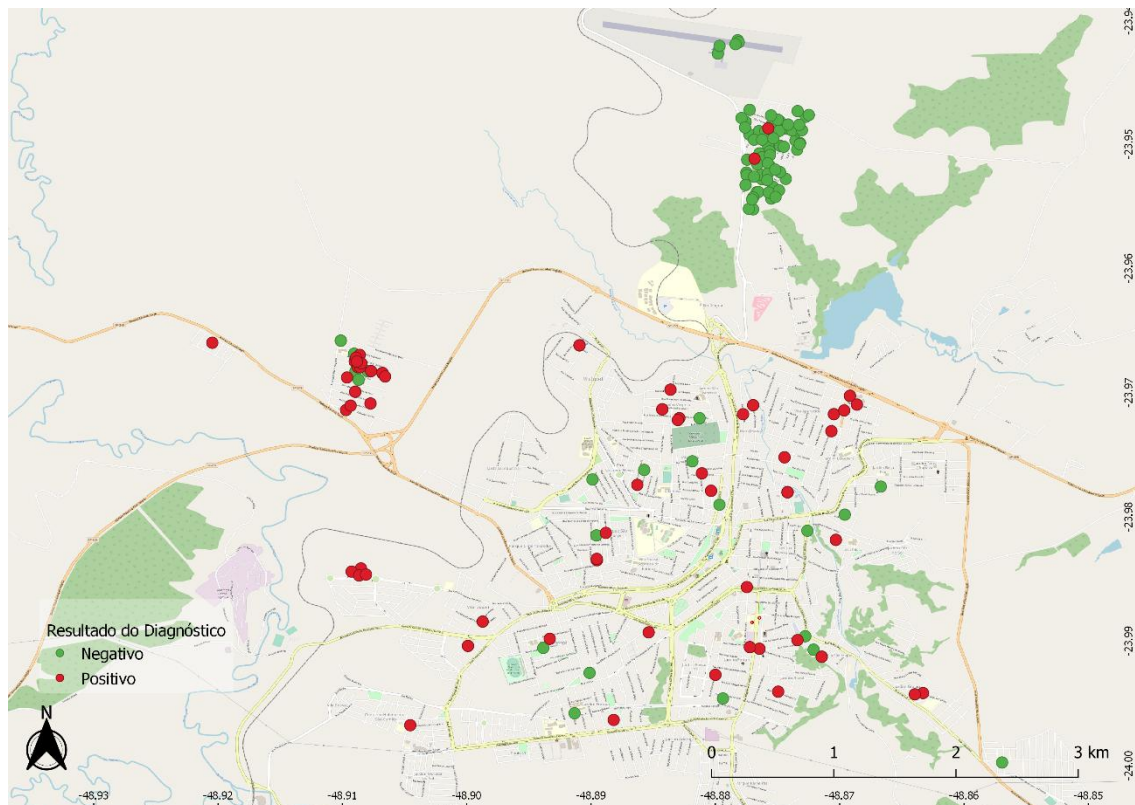


Tabela 3 - Frequência absoluta, relativa, moda e variação de títulos dos sorovares encontrados nos animais sororeagentes, independentemente de ser único ou coaglutinação no município de Cananeia, SP.

Sorovar	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)	Título (variação)
Canicola	2	33,33	100-400
Hebdomadis	1	16,66	200
Copenhageni	1	16,66	800
Icterohaemorrhagiae	1	16,66	100
Cynopteri	1	16,66	100
Total	6	100	

Figura 2 – Distribuição dos cães sororeagentes e não reagentes para leptospirose no município de Cananeia, São Paulo.

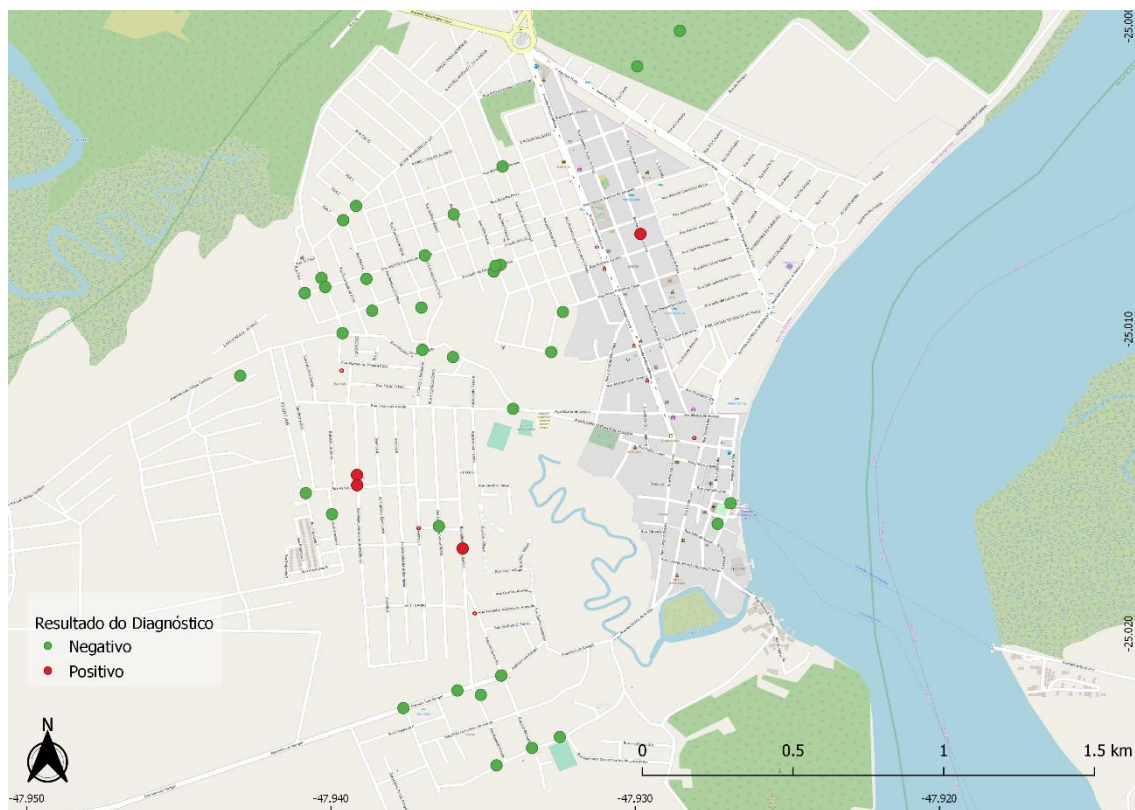
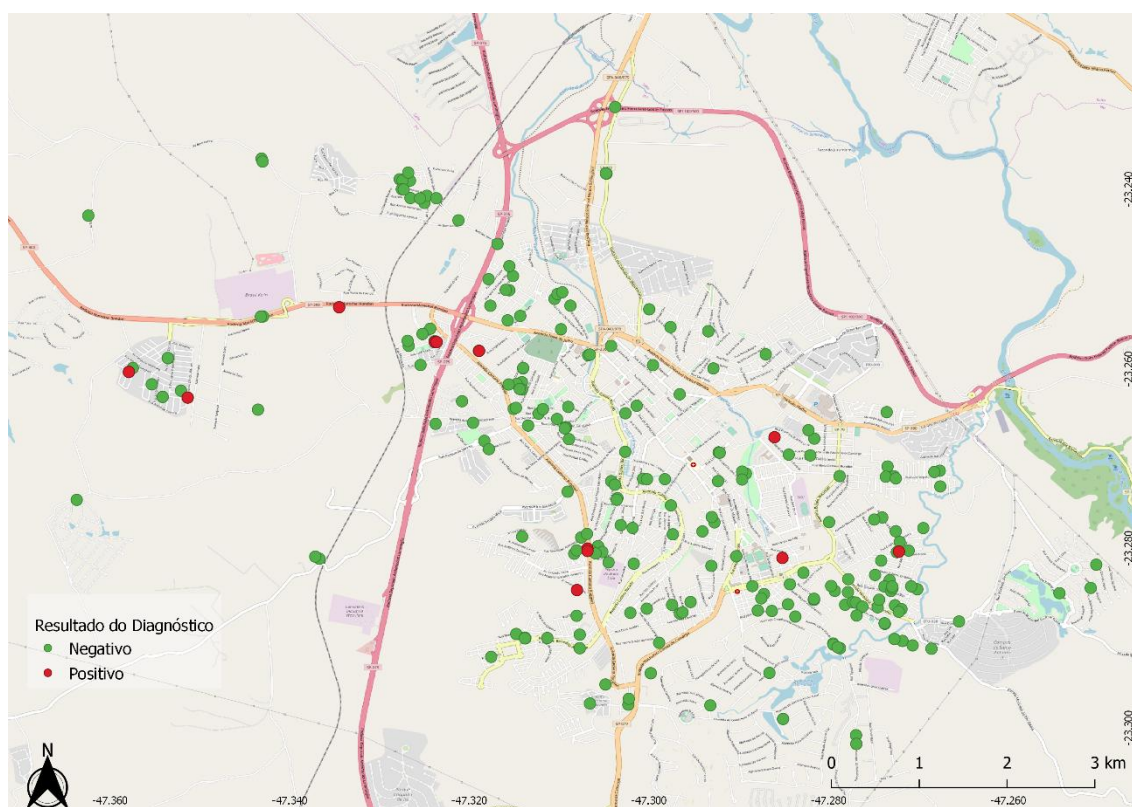


Tabela 4 - Frequência absoluta, relativa, moda e variação de títulos dos sorovares encontrados nos animais sororeagentes, independentemente de ser único ou coaglutinação no município de Itu, SP.

Sorovar	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)	Título (variação)	Moda
Australis	1	3,85	100	100
Bratislava	1	3,85	100	100
Autumnalis	1	3,85	100	100
Canicola	5	15,38	100 e 200	100 e 200
Cynopteri	2	7,69	100	100

Grippotyphosa	3	11,54	200	200
Copenhageni	2	7,69	100-200	100 e 200
Icterohaemorrhagiae	2	7,69	200-800	200 e 800
Pomona	5	19,23	100-400	100 e 200
Andamane	1	3,85	200	200
Total	27	100		

Figura 3 – Distribuição dos cães sororeagentes e não reagentes para leptospirose no município de Itu, São Paulo.



6. Discussão

No Brasil, a prevalência da leptospirose canina varia muito dependendo da região e amostragem utilizadas e presença ou ausência de manifestações clínicas (Vasconcellos et al. 1997, Favero et al. 2001; Favero et al. 2002;Rodrigues et al. 2007;Oliveira 2010,Fonzar e Langoni 2012, Morikawa et al 2015, Jorege et al. 2017; Latosinski et al. 2018,Miotto et al. 2018c). Na região estudada, optou-se por trabalhar com amostras de conveniência provenientes de cães assintomáticos atendidos por campanhas de esterilização cirúrgica. Para efeito de análise, o animal que apresentou o título máximo igual ou maior que 800 para leptospirose foi considerado como tendo infecção ativa.

Do total de 572 amostras analisadas nos quatro município, 121 foram reagentes para *Leptospira* spp.. O município de Itapeva (42,6%) apresentou a maior frequência de animais reagentes, seguido de Apiaí (40,5%) e, por fim, Cananeia (7,79%) e Itu (2,4%). As quatro cidades possuem biomas e densidade populacional distintas e essas características inerentes a cada município juntamente com o manejo que esses animais são submetidos (domiciliação, vacinação, procedência, idade) podem estar influenciando a distribuição do agente (Silva et al. 2006, Dias e Cipullo, 2012, Bier et al. 2013).

Das 109 amostras reagentes para *Leptospira* spp.,71 (65,14%) tinham título acima de 800, caracterizando infecção ativa, sendo que, dessas, 65,14% foram provenientes de animais do município de Itapeva, 15,5%, de Apiaí e 1,4% de Cananeia.

Apesar da ocorrência semelhante de animais sororeagentes à leptospira nos municípios de Apiaí (40,5%) e Itapeva (46,6%), esse resultado deve ser analisado com cautela.

Em Apiaí, as amostras foram provenientes de cães de um único abrigo e a variante sorológica mais provável foi a Canicola. O encontro do sorogrupo Canicola como o mais provável e animais com infecção ativa (Tabela 1) indica que o sorogrupo Canicola está sendo mantido na população. Já foi relatado o

encontro de leptospira em cães sem sintomatologia (Adler, Moctezuma 2010b, Miotto et al. 2018) evidenciando risco de transmissão do agente para os possíveis adotantes e funcionários, portanto, medidas como uso de equipamento de proteção individual (EPIS), quarentena, vacinação e tratamento para diminuir a circulação do agente entre os cães do abrigo e para eliminar o caráter de possível portador dos cães do canil deveriam ser instituídas para minimizar a possível transmissão para os humanos, como já evidenciada por Sakata et al. (1992) e Damião (2015).

Em contrapartida, observou-se no município de Itapeva adispersão de animais sororeagentes em 29 bairros do município, sendo o sorogrupo mais provável o Copenhageni, cujo hospedeiro de manutenção é o rato (*Rattus norvegicus*). Ressalta-se que 26 animais apresentaram títulos maiores ou iguais a 800. Pelo mapa do município (Fig. 1), pode-se observar que houve um aglomerado de amostras provenientes dos Bairros Vila Santa Maria e Bela Vista, justificado pela realização dos mutirões nesses locais. Ambos os bairros se situam às margens da rodovia.

O Bairro Vila Santa Maria, na época da colheita, era localizado na frente de um lixão que ficava no outro lado da rodovia e muitas famílias trabalhavam com reciclagem. Atualmente, o lixão foi desativado. Dos 87 soros analisados do Bairro Vila Santa Maria, apenas 2 foram reagentes para a leptospira, 1 para a variante sorológica Autumnalis, com título de 100 e outro, para a Wolffi, com título 400. O encontro de Autumnalis já foi descrita por outros autores (Batista et al., 2004; Aguiar et al., 2007; Castro et al., 2011; Pinto et al., 2017) e juntamente com a sorovariante Wolffi, indicam o compartilhamento do ambiente por diferentes espécies animais.

Já no Bairro Bela Vista, a maior ocorrência é da variante sorológica Copenhageni (12/17) entre os animais sororeagentes, indicando que medidas de desratização, anti-ratização e educação em saúde seriam necessárias para diminuir a contaminação ambiental e diminuir a probabilidade de infecção humana, pois é conhecido que a maioria das infecções humanas no Brasil e no mundo dá-se pelos sorovares Copenhageni e Icterohaemorrhagiae, ambos pertencentes ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae. (Acha, Szyfres 1989;

Guernier et al 2016; Pagès et al 2016). Cabe observar que 6 animais apresentavam no momento da colheita título maior que 800, caracterizando, segundo critério utilizado, infecção ativa.

Em Cananeia, 7,69% (4/52) dos animais foram reagentes para *Leptospira* spp. (Tabela 3) e apenas um animal com título igual a 800 para o sorovar Copenhageni. Os demais apresentaram títulos para Hebdomadis (1 animal com título 200), outro título 100 para Canicola, 100 para Cynopteri e o quarto apresentou co-aglutinação para as variantes sorológicas Canicola, Copenhageni e Icterohaemorrhagiae. Os animais que apresentaram títulos para sorovar único para Canicola e Hebdomadis possuíam moradia na mesma rua, no Bairro de Acaraú, evidenciando contato com diferentes hospedeiros, provavelmente devido a maior contato entre áreas de floresta com o município (Carvalho, 2016). Os outros animais são provenientes dos Bairros Rocio e Carijo (Fig 2). Interessante notar que nesses mesmos bairros foi demonstrado a presença do agente da febre maculosa (Carvalho, 2016), evidenciando mais uma vez a possibilidade de utilizar as amostras provenientes de campanhas de esterilização como fonte de dados da saúde animal e como preditor da saúde humana.

Em Itu, as 14 amostras positivas para leptospira foram encontradas em nove bairros diferentes (Fig 3), sendo a variante sorológica mais provável a Canicola. Apenas 1 amostra apresentou título 800 para o sorovar Canicola. Esse foi a cidade com o maior número de amostras. Elas foram provenientes de triagem realizada anteriormente à esterilização cirúrgica realizadas pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ). Nas cidades de Apiaí, Itapeva e Cananeia as colheitas foram realizadas durante as campanhas em parceria do município com extensão universitária.

Numa revisão sistemática realizada por Pinto et al. (2017), observou-se que os sorogrupos mais prevalentes encontrados em cães foram o Canicola e Icterohaemorrhagiae, os mesmos encontrados nos municípios estudados, evidenciando contato com direto ou indiretos com as fontes de infecção.

Mesmo em períodos mais secos do ano (quadro 1), a grande contaminação ambiental por leptospira não pode ser descartada, como pode

ser observada, principalmente, no município de Itapeva, causando um alerta para os agentes promotores da saúde humana e animal.

Tendo em vista a disseminação da infecção por leptospira nos animais atendidos por programas de esterilização cirúrgica para controle populacional de cães e gatos, medidas de biossegurança como o uso de equipamentos de proteção individual para minimizar a transmissão do agente através das mucosas deveriam ser adotadas pelas equipes de castração.

A instituição de monitoramento, quarentena, diagnóstico, vacinação e tratamento de cães de abrigo assintomáticos deveriam ser medidas de rotina para minimizar riscos de infecções para funcionários, voluntários e adotantes.

O monitoramento de doenças zoonóticas e contaminação ambiental através de cães submetidos à esterilização cirúrgica em projetos de controle populacional desenvolvidas por municípios através das políticas públicas ou em parcerias com a extensão universitária, principalmente em municípios onde existe maior dificuldade de colheita de dados devido à logística, poderiam ser utilizadas como estratégias para monitorar saúde animal e humana.

7. Conclusão

Todos os municípios estudados apresentaram cães assintomáticos sororeagentes para leptospira com frequências variadas.

Foi possível verificar a ocorrência de animais com infecção ativa nos quatro municípios.

Os sorogrupos Canicola e/ou Icterohaemorrhagiae foram os sorogrupos mais prováveis encontrados nos animais soropositivos, independente da infecção ser ativa ou não.

8. Referências Bibliográfica

- Abb J. Acute leptospirosis in a triathlete. *Wilderness Environ Med.* 13(1):45-7, 2002.
- Acha PN, Szyfres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Washington. 2 ed Organizacion Panamericana de la Salud. N.503. 1989. 989p.
- Adler B; Moctezuma AP. *Leptospira* and Leptospirosis. *Vet Microbiol.* 140(3-4):287-96; 2010a.
- Adler B, Moctezuma AP. Leptospirosis. In: *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals, Fourth Edition* Edited by C L Gyles, J F Prescott, J G Songer, C O Thoen Ed Blackwell Publishing. 2010. p. 527-547b.
- Aguiar DM, Cavalcante GT, Marvulo MFV, Silva JCR, Pinter A, Vanconcellos SA, et al. Fatores de risco associados à ocorrência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. Em cães do município de Monte Negro, Rondônia, Amazônia Ocidental Brasileira. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2007; 59:70-76.
- Azocar-Aedo L, Monti G. Meta-analyses of factors associated with Leptospirosis in domestic dogs. *Zoonoses Public Health.* 2015. doi:10.1111/zph.12236
- Barragan V, Nieto N, Keim P, Pearson T. Meta- analysis to estimate the load of *Leptospira* excreted in urine: beyond rats as important sources of transmission in low- income rural communities. *BMC Res Notes.* 10:71, 1-7, 2017. DOI 10.1186/s13104-017-2384-4
- Barrio B; Vangroenweghe F; Dosogne; H.; Burvenich; C. Decreased neutrophil bactericidal activity during phagocytosis of a slime-producing *Staphylococcus aureus* strain. *Vet Research.* 31:603-609; 2000.
- Batista CSA, Azevedo SS, Alves CJ, Vasconcellos AS, Morais M, Clementino IJ, et al. Soroprevalência de leptospirose em cães errantes da cidade de Patos, Estado da Paraíba, Brasil. *Braz J Vet Res Anim Sci* 2004; 41:131-136.
- Batista CF; Souza FN; Santos KR; Sanchez LCRR; Bertagnon HG; Blagitz MG; Gomes RC; Lage AP; Heinemann MB; Della Libera AMMP. R-Phycoerythrin-labelled *Mannheimia haemolytica* for the simultaneous measurement of phagocytosis and intracellular reactive oxygen production in bovine blood and bronchoalveolar lavage cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 196:53-59, 2018.
- Bier D, Shimakura SE, Morikawa VM, Ullmann LS, Kikuti M, Langoni H, Biondo AW, Molento MB Análise espacial do risco de leptospirose canina na Vila Pantanal, Curitiba, Paraná. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 33(1):74-79, 2013
- Blagitz MG; Souza FN; Batista CF; Azevedo LFF; Benites NR; Melville PA; Diniz SA; Silva MX; Haddad JPA; Heinemann MB; Cerqueira MMOP; Della

- Libera AMMP. The neutrophil function and lymphocyte profile of milk from bovine mammary glands infected with *Streptococcus dysgalactiae*. *J Dairy Res.* 82:460-469, 2015b.
- Blagitz MG; Souza FN; Batista CF; Azevedo LFF; Sanchez EMR; Diniz SA; Silva MX; Haddad JP; Della Libera AMMP. Immunological implications of bovine leukemia virus. *Res Vet Sci.* 114:109-116, 2017.
- Blagitz MG; Souza FN; Batista CF; Diniz SA; Azevedo LFF; Silva MX; Haddad JPA; Heinemann MB; Cerqueira MMOP; Della Libera AMMP. Flow cytometric analysis: Interdependence of healthy and infected udder quarters. *J Dairy Sci.* 98:2401-2408, 2015a.
- Blazius R.D., Romão P.R.T., Blazius E.M.C.G. & Silva O.S. 2005. Ocorrência de cães errantes soropositivos para *Leptospira* spp. na cidade de Itapema, Santa Catarina, Brasil. *Cad. Saúde Públ.* 21:1952-1956
- Brasil. Doenças Infecciosas e Parasitárias: Guia de Bolso. 8 ed. Brasília. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Brasília: Ministério da Saúde; 2010. 444 pp. http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doencas_infecciosas_parasitaria_guia_bolso.pdf
- Brod CS, Aleixo JAG, Jouglard SDD, Fernandes CPH, Teixeira JLR, Dellagostin AO. Evidência do cão como reservatório da leptospirose humana: isolamento de um sorovar, caracterização molecular e utilização em inquérito sorológico. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 38(4):294-300, 2005
- Castro JR, Salaberry SRS, Souza MA, Lima-Ribeiro AMC. Sorovares de *Leptospira* spp. predominantes em exames sorológicos de caninos e humanos no município de Uberlândia, Estado de Minas Gerais *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 44(2):217-222, mar-abr, 2011
- Cameron CE. Leptospiral structure, physiology, and metabolism. In Adler B. *Leptospira and Leptospirosis*. New York. Ed Springer. 2015. p. 21-42 ISSN 2196-9965, doi 0.1007/978-3-662-45059-8.
- Carvalho, AS. Inquérito Sorológico de anticorpos anti-rickettsia em cães do município de Cananeia e Itapeva, estado de São Paulo, Brasil. 2016. Dissertação apresentada ao Programa de Stricto Sensu da Universidade Santo Amaro-UNISA. 2016
- Chassin C., Picardeau, M., Goujon J. M., Bourhy P., Quellard N., Darche S. TLR4- and TLR2-mediated B cell responses control the clearance of the bacterial pathogen, *Leptospira interrogans*. *J. Immunol.* 183: 2669–2677, 2009.
- Costa E, Costa YA, Lopes AA, Sacramento E, Bina JC. Formas graves de leptospirose: aspectos clínicos, demográficos e ambientais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 34(3): 261-267, 2001
- Costa F; Hagan JE; Calcagno J; Kane M; Torgerson P; Martinez-Silveira MS; Stein C; Abela-Ridder B; Ko AI. Global morbidity and mortality of

- Leptospirosis: A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 9(9): e0003898, 2015.
- Damião, AO. Caracterização das leptospiroses isoladas dos pacientes atendidos no Hospital Couto Maia. Dissertação (Mestrado de Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2015.
- DeFries RS; Rudel T; Uriarte M; Hansen M. Deforestation driven by urban population growth and agricultural trade in the twenty-first century. *Nature Geoscience*. 3:178–181, 2010.
- Dias JP, Teixeira MG, Costa MCN, Mendes CMC, Guimarães P, Reis MG, Ko A, Barreto ML. Factors associated with *Leptospira* sp infection in a large urban center in northeastern Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 40(5):499-504, 2007
- Enrietti MA. Contribuição ao conhecimento da incidência de leptospiroses em murédeos, caninos e suínos no Paraná. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. Jubilee Volume (1946-2001): 311-342. 2001.
- FAINE S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. *Leptospira and leptospirosis*. 2nd. ed. Melbourne: Medi. Sci., 1999. 272p.
- Faine, S.; Adler, B.; Bolin, C. et al. *Leptospira and leptospirosis*. 2nd ed. Melbourne, Australia: MedSci, 326p, 1999.
- Faria MT, Calderwood MS, Athanzio DA, McBride AJA, Hartskeerl RA, Pereira MM, et al. Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. *Acta Trop*. 2008;108(1):1–5. doi:10.1016/j.actatropica.2008.07.005.
- Favero ACM, Pinheiro SR, Vasconcellos SA, Moraes ZM, Ferreira F, Ferreira Neto JS. Sorovares de leptospiroses predominantes em exames sorológicos de bubalinos, ovinos, caprinos, eqüinos, suínos e cães de diversos estados brasileiros. *Ciênc Rural* 2002; 32:613-619.
- Favero ACM, Pinheiro SR, Vasconcellos SA, Moraes ZM, Ferreira F, Ferreira Neto JS. Leptospirose bovina: variantes sorológicas predominantes em colheitas efetuadas no período de 1984 a 1997 em rebanhos de 21 Estados brasileiros. *Arq Inst Biol Sao Paulo* 2001; 68:29-35.
- Fonzar UJV, Langoni H. Geographic analysis on the occurrence of human and canine leptospirosis in the City of Maringá, State of Paraná, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 45(1):100-105, 2012
- Ganoza CA; Matthias MA; Collins-Richards D; Brouwer KC; Cunningham CB. Determining risk for severe leptospirosis by molecular analysis of environmental surface waters for pathogenic *Leptospira*. *PLoS Med*. 3:e308, 2006.
- Gautam R, Wu CC, Guptill LF, Potter A, Moore GE. Detection of antibodies against *Leptospira* serovars via microscopic agglutination tests in dogs in the United States, 2000–2007. *JAVMA*. 237(3):293-98, 2010

- Goldstein R.E. 2010. Canine leptospirosis. *The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 40(6): 1091-1101.
- Gomes-Solecki; M.; Santecchia; I.; Werts; C. Animal models of leptospirosis: of mice and hamsters. *Frontiers in Immunology*. 8:58, 2017.
- Gonçalves AP. Avaliação da eficácia de bacterina antileptospirose suína: relação entre resultado do teste de inibição do crescimento de leptospiras in vitro aplicado ao soro de suínos com o obtido no teste de potência in vivo em hamsters. 2012. 109p. (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2012.
- Grassmann AA.; Souza JD; McBride AJ. A universal vaccine against leptospirosis: are we going in the right direction? *Frontiers in Immunology*. 8:256, 2017.
- Greene CE, Sykes JE, Moore GE, Goldstein RE, Schultz RD. Chapter 42 Leptospirosis. In: Greene CE *Infectious diseases of the dog and cat*. 4 ed. Saunders Ed. St Louis, Missouri. p.431-447. 2012
- Grobusch MP, Bollmann R, Schönberg A, Slevogt H, Garcia V, Teichmann D, Jelinek T, Flick H, Bergmann F, Rosseau S, Temmesfeld-Wollbrück B, Suttorp N. Leptospirosis in travelers returning from the Dominican Republic. *J Travel Med*. 10(1):55-8, 2003.
- Guernier V, Lagadec E, Cordonin C, Le Minter G, Gomard Y, Pagès F, Jaffar-Bandjee MC, Michault A, Tortosa P, Dellagi K. Human Leptospirosis on Reunion Island, Indian Ocean: Are Rodents the (Only) Ones to Blame? *PLoS Negl Trop Dis*.10(6):e0004733.
- Guimarães YV. Animais sentinelas em doenças infecciosas. Monografia – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2015. 20p.
- Haake DA. Hamster model of leptospirosis. *Curr Protoc Microbiol*. Chapter 12:Unit 12E.2, 2006.
- Hagiwara MK. Leptospirose canina. *Pfizer Saúde Animal. Boletim Técnico*. 11:1-6, 2003.
- Hagiwara MK, Lustosa M, Kogika MM. Leptospirose canina. *Vet News*. 11(67): 7-8, 2004.
- Hammerbeck CD; Hooper JW. T cells are not required for pathogenesis in the Syrian hamster model for hantavirus pulmonary syndrome. *J Virol*. 85:9929-9944, 2011.
- Jorge S, Schuch RA, Oliveira NR, Cunha CEP, Gomes CK, Oliveira TL, Rizzi C, Qadan AF, Pacce VD, Recuero ALC, Brod CS, Dellagostin OA. Human and animal leptospirosis in Southern Brazil: A five-year retrospective study. *Travel Medicine and Infectious Disease*. 18: 46e52, 2017.

- Koizumi N; Watanabe H. Leptospirosis vaccine: past; present; and future. *J Postgrad Med.* 51:210-214, 2005.
- Lastovicka J; Rataj M; Bartunková J. Assessment of lymphocyte proliferation for diagnostic purpose: comparison of CFSE staining; Ki67 expression and H-thymidine incorporation. *Hum Immunol.*; 77:1215-1222, 2016.
- Latosinski GS, Fornazari F, Babboni SD, Caffaro K, Paes AC, Langoni H. Serological and molecular detection of *Leptospira* spp in dogs *Rev Soc Bras Med Trop.* 51(3):364-367, 2018. doi: 10.1590/0037-8682-0276-2017
- Lee, HS, Levine M., Guptill-Yoran, C. Regional and temporal variations of leptospira seropositivity in dogs in the United States, 2000-2010. *Journal of Veterinary Internal Medicine.* 28: 779-788. 2014.
- Lee HS; Guptill L; Johnson AJ; Moore GE. Signalment changes in canine leptospirosis between 1970 and 2009. *J Vet Intern Med.* 28:294-299, 2014.
- Levett PN. Leptospirosis. *Clinical Microbiology Rewiews.* v. 14, n. 2, p. 296-326, 2001.
- Levett PN. Systematics of leptospiraceae. *Curr Top Microbiol Immunol.* 387:11-20, 2015. doi: 10.1007/978-3-662-45059-8_2.
- Lin X; Xiao G; Luo D; Kong L; Chen X; Sun D; Yan J. Chimeric epitope vaccine against *Leptospira interrogans* infection and induced specific immunity in guinea pigs. *BMC Microbiol.* 16:241, 2016.
- Lunn KF. Leptospirosis in Dogs. *MSD Manual Veterinary Manual.* 2019. <https://www.msdsmanual.com/generalized-conditions/leptospirosis/leptospirosis-in-dogs>
- Major A, Schweighauser A, Francey T. Increasing incidence of canine leptospirosis in Switzerland. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 11: 7242-7260. 2014
- Martin LE, Wiggans KT, Wennogle SA, Curtis K, Chandrashekar R, Lappin MR. Vaccine-associated *Leptospira* antibodies in client-owned dogs. *J Vet Intern Med.* 28(3):789-92, 2014.
- Matsui M, Rouleau V, Bruyère-Ostells L, Goarant, C. Gene expression profiles of immune mediators and histopathological findings in animal models of leptospirosis: comparison between susceptible hamsters and resistant mice. *Infect. Immun.* 79:4480–4492. 2011
- Mayer-Scholl A, Luge E, Draeger A, Nockler K, Kohn B. Distribution of *Leptospira* Serogroups in Dogs from Berlin, Germany *Vector-Borne And Zoonotic Diseases.* 13(3):200-2, 2013. Doi: 10.1089/vbz.2012.1121.
- McBride AJ, Athanazio DA, Reis MG, Ko AI. Leptospirosis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 18: 376–386, 2015.
- Mendes CO; de Souza EP; Borja-Cabrera GP; Batista LMM; Santos MA; Parra LE; Menz I; Palatnik M; Sousa CBP. IgG1/IgG2 antibody dichotomy in sera

of vaccinated or naturally infected dogs with visceral leishmaniosis. *Vaccine*. 21:2589-2597, 2003.

Miotto BA, Guilloux AGA, Tozzi BF, Moreno LZ, da Hora AS, Dias RA, Heinemann MB, Moreno AM, Souza-Filho AF, Lilenbaum W, Hagiwara MK. Prospective study of canine leptospirosis in shelter and stray dog populations: Identification of chronic carriers and different *Leptospira* species infecting dogs. *PLoS ONE* 13(7): e0200384, 2018c. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200384>

Miotto BA, Hora AS, Taniwaki SA, Brandão PE, Heinemann MB, Hagiwara MK. Development and validation of a modified TaqMan based real-time PCR assay targeting the *lipL32* gene for detection of pathogenic *Leptospira* in canine urine samples. *Braz J Microbiol*. 49(3):584-590. 2018a. doi: 10.1016/j.bjm.2017.09.004.

Miotto BA, Tozzi BF, Penteadó MS, Guilloux AGA, Moreno LZ, Heinemann MB, Moreno AM, Lilenbaum W, Hagiwara MK. Diagnosis of acute canine leptospirosis using multiple laboratory tests and characterization of the isolated strains. *BMC Vet Res*. 14(1):222. 2018b. doi: 10.1186/s12917-018-1547-4.

Miotto BA; Moreno LZ; Guilloux AGA; Sousa GO; Loureiro AP; Moreno AM; Lilenbaum W; Vasconcellos SA; Heinemann MB; Hagiwara MK Molecular and serological characterization of the first *Leptospira santarosai* strain isolated from a dog. *Acta Trop*. 162:1-4, 2016.

Morikawa VM, Bier D, Pellizzaro M, Ullmann LS, Paploski IAD, Kikuti M, Langoni H, Biondo AW, Molento MB. Seroprevalence and seroincidence of *Leptospira* infection in dogs during a one-year period in an endemic urban area in Southern Brazil *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 48(1):50-55, 2015. doi:10.1590/0037-8682-0213-2014.

Mwachui MA; Crump L; Hartskeerl R; Zinsstag J; Hattendorf J. Environmental and Behavioural Determinants of Leptospirosis Transmission: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis*. 9(9): e0003843; 2015.

Naiman BM; Alt D; Bolin CA; Zuerner R; Baldwin CL. Protective killed *Leptospira borgpetersenii* vaccine induces a potent Th1 immunity comprising responses by CD4 and gamma delta T lymphocytes. *Infect Immun*. 69:7550-7558, 2001.

Naiman BM; Blumberg S; Alt D; Bolin CA; Brown R; Zuerner R; Baldwin CL. Evaluation of type 1 immune response in naïve and vaccinated animals following challenge with *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo: involvement of WC1+ $\gamma\delta$ and T CD4 cells. *Infect. Immun*. 70:6147-6157, 2002.

Nally JE, Mullen W, Callanan JJ, Mischak H, Albalat A. Detection of urinary biomarkers in reservoir hosts of leptospirosis by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Proteomics Clin Appl*. 9(5-6):543-51, 2015

- Nally JE, Wilson-Welder JH, Hornsby RL, Palmer MV and Alt DP. Inbred Rats as a Model to Study Persistent Renal Leptospirosis and Associated Cellular Immune Responsiveness. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8:66, 2018.
- Nava AFD. Espécies sentinelas para a Mata Atlântica: as consequências epidemiológicas da fragmentação florestal no Pontal do Paranapanema, São Paulo. Tese. Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2008. 147 p.
- Nieto Farias MV; Souza FN; Lendez PA; Martínez-Cuesta L; Santos KR; Della Libera; AMMP; Ceriani MC; Dolcini GL. Lymphocyte proliferation and apoptosis of lymphocyte subpopulations in bovine leukemia virus-infected dairy cows with high and low proviral load. *Vet Immunol Immunopathol.* 206:41-46, 2018.
- Oliveira ST. Leptospirose canina: Dados clínicos, laboratoriais e terapêuticos em cães naturalmente infectados. Tese Ciências Veterinárias. UFRGS. 2010
- Pagès F, Larrieu S, Simoes J, Lenabat P, Kurtkowiak B, Guernier V, Le Minter G, Lagadec E, Gomard Y, Michault A, Jaffar-Bandjee MC, Dellagi K, Picardeau M, Tortosa P, Filleul L. Investigation of a leptospirosis outbreak in triathlon participants, Réunion Island, 2013. *Epidemiol Infect.* 144(3):661-9, 2016.
- Picardeau M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Med Mal Infect.* 43(1):1-9, 2017.
- Picardeau, M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 43(1): 1–9, 2013
- Pinto OS, Libonati H, Lilenbaum W. A systematic review of leptospirosis on dogs, pigs, and horses in Latin America. *Trop Anim Health Prod.* 49:231–238, 2017. Doi:10.1007/s11250-016-1201-8
- Pinto PS; Libonati H, Lilenbaum W. A systematic review of leptospirosis on dogs, pigs, and horses in Latin America. *Trop Anim Health Prod.* 49:231-38, 2017.
- Polachini, CO; Fujimori K. Leptospirosis canina y humana, una posible transmisión conjuntival en el Municipio de São Paulo, Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Pan-Amaz Saude* 2015; 6(1):59-65
- Reagan KL, Sykes JE. Diagnosis of Canine Leptospirosis. *Vet Clin Small Anim.* 49:719–731. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2019.02.008>
- Rees J; Haig D; Mack V; Davis WC. Characterization of monoclonal antibodies specific for hamster leukocyte differentiation molecules. *Vet Immunol Immunopathol.* 183:40-44, 2017.
- Reis RB; Ribeiro GS; Felzemburgh RDM; Santana FS; Mohr S; et al. Impact of environment and social gradient on *Leptospira* infection in urban slums. *PLoS Negl Trop Dis.* 2: e228, 2008.

- Reis, R.B., Ribeiro, G.S., Felzemburgh, R.D.M., Santana, F.S., Mohr, S., Melendez, A.X.T.O., Queiroz, A., Santos, A.C., Ravines, R.R., Tassinari, W.S., et al., 2008. Impact of environment and social gradient on *Leptospira* infection in urban slums. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2, e228
- Renaud C, Andrews S, Djelouadji Z, Lecheval S, Corrao-Revol N, Buff S, Demont P, Kodjo A. Prevalence of the *Leptospira* serovars bratislava, grippotyphosa, mozdok and pomona in French dogs. *The Veterinary Journal*. 196:126–127, 2013.
- Rentko VT, Clark N, Ross LA, Schelling S. Canine leptospirosis a retrospective study of 17 cases. *J. Vet. Int. Med.* 6:235-44, 1992.
- Richer L, Potula HH, Melo R, Vieira A, Gomes-Solecki M. Mouse model for sublethal *Leptospira interrogans* infection. *Infect. Immun.* 83:4693–4700, 2015.
- Richtzenhain LJ; Cortez A; Heinemann MB; Soares RM; Sakamoto SM; Vasconcellos SA; Higa ZMM; Scarcelli E; Genovez ME. A multiplex PCR for detection of *Brucella* spp and *Leptospira* spp. DNA from aborted bovine fetuses. *Vet Mic.* 87:139-147, 2002.
- Rodrigues AMA, Vasconcellos AS, Moraes ZM, Hagiwara MK. Isolamento de *Leptospira* spp. de cães com diagnóstico clínico de leptospirose em São Paulo (Brasil). *Acta Scientiae Veterinariae*. 35: s705-s706, 2007
- Rodrigues AMA, Vasconcelos SA, Gonçalves AP, Moraes ZM, Souza GO, Hagiwara MK. Anticorpos revelados pelo teste de inibição do crescimento de leptospirosas in vitro (TICL) contra os sorovares Canicola, Icterohaemorrhagiae e Copenhageni em cães adultos revacinados anualmente com vacina comercial contendo bacterinas dos sorovares Canicola, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa e Pomona. *Pesq. Vet. Bras.* 33(5):627-634, 2013
- Rodrigues RO, Hermann GP, Heinemann MB, Lage AP, Lopes LB, Moreira EC. Comparação entre a imunidade induzida em bovinos vacinados com bacterinas polivalentes comerciais e uma monovalente experimental. *Pesq. Vet. Bras.* 31(1):10-16, 2011.
- Sakata EE, Yasuda PH, Romero EC, Silva MV, Lomar AV. Sorovares de *Leptospira interrogans* isolados de casos de leptospirose humana em São Paulo, Brasil. *Ver. Inst. Med. Trop.* 34(3):217-21, 1992.
- Schuller S, Francey T, Hartmann K, Hugonnard M, Kohn B, Nally JE, Sykes J. European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats. *Journal of Small Animal Practice*. 56: 159–179. 2015. DOI: 10.1111/jsap.12328
- Schuller S; Francey T; Hartmann K; Hugonnard M; Kohn B; Nally JE; Sykes J. European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats. *J Small Anim*
- Soares A; Govender L; Hughes J; Mavajla W; Kock M; Barnard C; Pienaar B; Janse van Rensburg E; Jacobs G; Khomba G; Stone L; Abel B; Scriba TJ;

- Hanekom WA. Novel application of Ki67 to quantify antigen-specific in vitro lymphoproliferation. *J Immunol Methods*. 363:43-50, 2010.
- Srinivas GB; Walker A; Rippke B. USDA regulatory guidelines and practices for veterinary *Leptospira* vaccine potency testing. *Biologicals*. 41:298-302, 2013.
- Suepaul SM, Carrington CV, Campbell M, Borde G, Adesiyun AA. Seroepidemiology of leptospirosis in dogs and rats in Trinidad. *Tropical Biomedicine*. 31(4): 853–861, 2014.
- Tozzi, BF; Miotto BA; Penteado, MS; Hagiwara MK. Isolamento e identificação de leptospirosas patogênicas em cães com suspeita clínica de leptospirose. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP*, v. 15, n. 2, p. 90-90, 11 dez. 2017.
- Silva VBC, Stedile STO, Sousa RS, Sousa MG. 2017. Síndrome hemorrágica pulmonar em cão associada à leptospirose. *Acta Scientiae Veterinariae*. 45(Suppl 1): 240, P.1-5
- Vasconcellos SA. Leptospirose animal. In: 3 Encontro Nacional em Leptospirose. 1993. Rio de Janeiro. Anais.... Rio de Janeiro: Ministério da Saúde. 1993. P. 62-66
- Vasconcellos SA. Leptospirose animal. In: 3º Encontro Nacional em Leptospirose; 1993 out 19-22; Rio de Janeiro; Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 1993. p. 62-5. (copenhégani em cães no brasil)
- Vasconcellos SA. Leptospirose. *Biológico* 1997; 59:29-32.
- Vincent AT, Schiettekatte O, Goarant C, Neela VK, Bernet E, Thibeaux R, Ismail N, Mohd Khalid MKN, Amran F, Masuzawa T, Nakao R, Amara Korba A, Bourhy P, Veyrier FJ, Picardeau M. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLoS Negl Trop Dis*. 13(5):e0007270, 2019.
- Vincent AT, Schiettekatte O, Goarant C, Neela VK, Bernet E, Thibeaux R, Ismail N, Mohd Khalid MKN, Amran F, Masuzawa T, Nakao R, Amara Korba A, Bourhy P, Veyrier FJ, Picardeau M. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLoS Negl Trop Dis*. 13(5):e0007270, 2019.
- Volz MS, Moos V, Allers K, Luge E, Mayer-Scholl A, Nöckler K. Specific CD4+ T-Cell reactivity and cytokine release in different clinical presentations of leptospirosis. *Clin. Vaccine Immunol*. 22:1276–1284, 2015.
- Weese JS, Fulford MB. Bacterial Diseases. In Weese JS, Fulford Companion Animal Zoonoses. MB.Wiley-Blackweell 2011 Ames Iowa. P.109-240.
- Werts C Interaction of *Leptospira* with the Innate Immune System Current Topics in Microbiology and Immunology. 415:163-187, 2018.

White AM, Zambrana-Torrel C, Allen T, Rostal MK, Wright AK, Ball EC, Daszak P, Karesh WB. Hotspots of canine leptospirosis in the United States of America. *The Veterinary Journal*. 222: 29–35, 2017.

William E. Animal leptospirosis. In: Adler B, editor. *Leptospira and leptospirosis*. Berlin: Springer; 2014. p. 99–125.

Yupiana Y, Wilson PR, Weston JF, Vallée E, Collins-Emerson JM, Benschop J, Scotland T, Heuer C. Epidemiological investigation of *Leptospira* spp. in a dairy farming enterprise after the occurrence of three human leptospirosis cases. *Zoonoses Public Health*.66(5):470-479, 2019. doi: 10.1111/zph.12578.

Zuerner RL; Alt DP; Palmer MV; Thacker TC; Olsen SCA. *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo vaccine induces Th1 response; activates NK cells; and reduces renal colonization. *Clin Vaccine Immun*. 18:684-691, 2011.