

UNIVERSIDADE SANTO AMARO

Curso de Medicina Veterinária

Raquel Vieira Diodato

**PREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO ASSOCIADO À
LEPTOSPIROSE CANINA NO EXTREMO SUL DO MUNICÍPIO DE
SÃO PAULO**

São Paulo

2016

Raquel Vieira Diodato

**PREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO ASSOCIADO À
LEPTOSPIROSE CANINA NO EXTREMO SUL DO MUNICÍPIO DE
SÃO PAULO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Medicina
Veterinária da Universidade de Santo
Amaro – UNISA como requisito parcial
para obtenção do título Bacharel em
Medicina Veterinária.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Amane Paldês
Gonçales.

São Paulo

2016

Raquel Vieira Diodato

**PREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO ASSOCIADO À
LEPTOSPIROSE CANINA NO EXTREMO SUL DO MUNICÍPIO DE
SÃO PAULO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade de Santo Amaro – Unisa, como requisito parcial para obtenção do título Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador (a): Prof.^a Dr^a. Amane Paldês Gonçalves

São Paulo, de de 2016.

Banca Examinadora

Prof.

Prof.

Conceito Final

Dedico este trabalho de conclusão de curso aos meus pais, irmãos e ao meu marido, minha família, meus amores, que de muitas formas me ajudaram para que fosse possível a concretização deste curso e deste trabalho.

Quero agradecer, em primeiro lugar, a Deus, pela força e coragem durante toda esta longa caminhada.

À minha família, por sua capacidade de acreditar em mim, que não mediram esforços para me apoiar mesmo sem condições financeiras deram tudo que podiam para me ajudar.

Ao meu companheiro, hoje esposo Douglas, pessoa com quem amo partilhar a vida. Obrigada pelo carinho, pela força e incentivo, sempre acreditou e me ajudou em cada momento difícil.

Ao meu irmão Railson, que sempre me incentivou a estudar, acredita no meu potencial, me mostrou que estudar era questão de dedicação não de dinheiro, me ajudou na obtenção da bolsa de estudos, e nunca permitiu que eu desistisse.

Ao meu pai Raimundo, que não pôde pagar o curso, nem arcar com os custos exigidos para graduação, mas não mediu esforços para dar tudo que tinha para me ajudar.

A minha mãe Sandra, meu exemplo de paciência, força e carinho, nunca permitiu que me faltasse o essencial, me deu toda a base para que pudesse seguir.

A minha irmã Regiley, minha amiga, companheira que sempre me ajudou, e mesmo sem nenhuma obrigação garantiu que nada me faltasse.

A querida Professora orientadora, Amane Paldês Gonçalves, pela paciência na orientação, pelo grande incentivo e compreensão que tornou possível a conclusão deste trabalho.

A FAPESP pela concessão da bolsa de Iniciação Científica para realização deste projeto.

“Eu não tenho filosofia; tenho sentidos... Se falo na Natureza não é porque saiba o que ela é. Mas porque a amo, e amo-a por isso. Porque quem ama nunca sabe o que ama. Nem sabe por que ama, nem o que é amar...”

Alberto Caeiro

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi investigar a prevalência da leptospirose em cães no extremo sul do município de São Paulo e determinar os fatores de risco associado à infecção. Foram examinadas 198 amostras de soro sanguíneo de cães que participaram das campanhas de esterilização cirúrgica nas regiões de abrangência das Supervisão de Vigilância em Saúde de Parelheiros e da Capela do Socorro colhidas no período de agosto de 2015 a julho de 2016. Todas as amostras de soro foram submetidas à prova de soroadglutinação microscópica (SAM). Os proprietários responderam a um questionário epidemiológico para cada cão, elaborado de modo a fornecer dados com o intuito de verificar a ausência ou presença de algumas condições que podem atuar como possíveis fatores de risco para leptospirose canina. A prevalência de animais sororreagentes encontrada foi de 10,1% sendo Butembo e Grippothyphosa os sorovares mais prevalentes. Também foram encontradas reações para os sorovares Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, Canicola, Pomona e Guaicura. A variável presença de roedores ($p = 0,023$) foi a única identificada como fator de risco associado à sororreatividade para leptospirose. Os resultados servem como um alerta em relação à possibilidade de exposição humana aos fatores de risco para a leptospirose a que estão expostos estes cães, e reforça a necessidade de programas de controle da população de cães, através do controle da reprodução e estímulo da posse responsável.

Palavras-chave: Leptospirose canina; soro prevalência; fator de risco; controle populacional.

ABSTRACT

The objective of this research was to investigate a prevalence of leptospirosis in dogs in the extreme of the city of São Paulo and to determine the risk of risk associated with the infection. A total of 198 blood serum samples from dogs that participated in the surgical sterilization campaigns were examined in the areas covered by Parelheiros Health Surveillance and the Capela do Socorro from August 2015 to July 2016. All serum samples Microscopic serum agglutination test (SAM). The owners answered an epidemiological questionnaire for each dog, elaborated of data in order to verify the absence or the presence of some conditions that can update as possible risk factors for canine leptospirosis. The prevalence of seroreagent animals was found in 10.1% by Butembo and Grippothyphosa the most prevalent serovars. Reactions were also found for the serovars Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, Canicola, Pomona and Guaicura. The presence of rodents ($p = 0.023$) was identified as a risk factor associated with seroprevalence for leptospirosis. The results serve as an alert regarding the possibility of exposure to risk of a leptospirosis to which these dogs are exposed, and reinforce a need for programs to control the population of dogs through reproductive control and stimulus of responsible possession.

Keywords: Canine leptospirosis; Serum prevalence; risk factor; Population control.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Conceituação	11
1.2. Etiologia	11
1.3. Epidemiologia	13
1.4. Transmissão	16
1.5. Patogenia	16
1.6. Manifestações Clínicas	18
1.7. Diagnóstico	20
1.7.1 Diagnósticos diferenciais	20
1.8. Prognóstico	21
1.9. Tratamento	21
1.10 Profilaxia	22
2. JUSTIFICATIVA	24
3. OBJETIVO	26
3.1 Objetivo Principal	26
3.2 Objetivo Secundários	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 População alvo	27
4.2 Colheita de material Biológico	28
4.3 Fatores de risco associados à leptospirose - Questionário Epidemiológico	28
4.4 Teste de Soroaglutinação microscópica (SAM)	28
5. RESULTADOS	31
5.1. Resultados Sorológicos	31
5.2. Fatores de risco associados à leptospirose	32

6. DISCUSSÃO	34
7. CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS.....	38
APÊNDICE A	47
APÊNDICE B	48

1. INTRODUÇÃO

1.1. Conceituação

A leptospirose é uma doença infecto-contagiosa, causada por bactérias do gênero *Leptospira*. Trata-se de uma zoonose de distribuição mundial que acomete diversas espécies de animais silvestres, domésticos e seres humanos¹.

Os primeiros trabalhos sobre leptospirose em animais domésticos do Brasil foram de DACORSO FILHO e AZEVEDO & SANTOS², ambos entre 1940 a 1950 relacionados com estudos em cães. Nestes animais a doença é também conhecida como moléstia de Weil canina, tifo canino ou moléstia de Stuttgard³.

A leptospirose é uma doença de notificação compulsória ao serviço veterinário oficial, composto pelas unidades do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e pelos Órgãos Estaduais de Defesa Sanitária Animal, em atendimento ao art. 5º do Anexo do Decreto no 5741, de 30 de março de 2006⁴.

1.2. Etiologia

O agente etiológico da leptospirose é uma bactéria espiroqueta pertencente à ordem *Spirochaetales*, família *Leptospiraceae*, gênero *Leptospira*, cuja espécie *Leptospira interrogans* é considerada a causadora da patogenia, e a espécie não patogênica, saprófita é denominada *Leptospira biflexa*⁵.

Esta classificação baseia-se em testes sorológicos que resultam na determinação de diferentes sorovares os quais são distinguidos pela heterogeneidade estrutural dos carboidratos do lipopolissacarídeo (LPS). Os

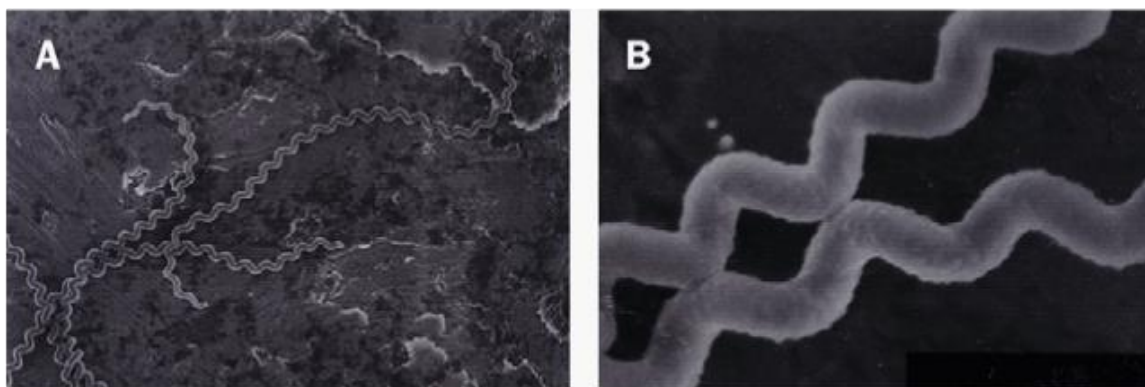
sorovares antigenicamente relacionados são agrupados em sorogrupos^{6,7}. Atualmente, são conhecidos mais de 250 sorovares, distribuídos em 24 sorogrupos⁸. Nesta classificação antigênica, determinado sorovar pode ser encontrado em várias espécies e os sorovares do mesmo sorogrupo podem apresentar reatividade cruzada, causando reações inespecíficas entre esses sorovares, levando à certa dificuldade no diagnóstico sorológico, essa reação é chamada de coaglutinação⁹.

A determinação do sorogrupo e/ou sorovar de uma amostra isolada pode ser realizada por meio do teste de reação da absorção de aglutininas ou por técnicas de biologia molecular métodos restritos a laboratórios especializados ou de referência¹⁰.

As leptospiras são bactérias espiraladas muito finas (com 0,1 μm de diâmetro e comprimento variando de 6 a 20 μm)^{8,11} e extremidades em forma de gancho (Figura 1). São aeróbicas estritas, de crescimento lento com divisão celular em torno de sete a doze horas. As culturas em meio líquido levam cinco a sete dias para atingir crescimento em temperatura em torno de 28°C a 30°C para serem utilizadas como antígeno^{8, 11, 12,13}.

Por serem muito finas, são visualizadas por microscópio de campo escuro ou contraste de fase e são fracamente coradas pelos corantes anílicos, entretanto, são visíveis quando coradas pela prata^{8, 9}.

Figura 1 – Microscopia eletrônica da *Leptospira interrogans*. (A) Observe características de extremidades em gancho. (B) Em alta ampliação a superfície da espiroqueta.



Fonte: (Mohammed et al 2011)¹⁴.

As leptospiros são bastante sensíveis à luz solar direta, aos desinfetantes comuns e aos antissépticos. O período de sobrevivência das leptospiros na água varia segundo a temperatura, o pH, a salinidade e o grau de poluição. Sua multiplicação é ótima em pH compreendido entre 7,2 a 7,4¹⁰.

No meio ambiente, sobrevivem bem em terrenos úmidos, córregos, lagos e locais com excesso de umidade¹¹.

1.3. Epidemiologia

Os animais infectados pelas leptospiros podem ser classificados em hospedeiros acidentais, hospedeiros de manutenção e/ou reservatórios. Sendo que os hospedeiros de manutenção são os responsáveis por manter esta doença na natureza, por meio da infecção crônica de seus túbulos renais, eliminando as leptospiros no ambiente pela urina (leptospirosúria). Já nos hospedeiros acidentais, não possuem importância na disseminação de leptospirose e a doença nesses depende da virulência e patogenicidade do sorovar infectante⁸.

Em relação aos hospedeiros, os cães são considerados hospedeiros de manutenção do sorovar Canicola e o rato de esgoto (*Rattus norvegicus*) dos sorovares Icterohaemorrhagiae e Copenhageni. Os suínos, bovinos e os animais silvestres são hospedeiros de manutenção dos sorovares Pomona, Hardjo e Grippotyphosa, respectivamente (Quadro 1) . A ocorrência de diferentes sorovares de leptospiros no homem e nos animais domésticos está na dependência de reservatórios existentes no ecossistema onde vive o hospedeiro acidental¹³.

Quadro 1 - Hospedeiro de manutenção dos sorogrupos de *Leptospira* spp. mais frequentemente envolvidos na infecção de cães no mundo.

Sorogrupo	Hospedeiro de Manutenção
Canicola	Cão
Icterohaemorrhagiae	<i>Rattus norvegicus</i>
Copenhageni	<i>Rattus norvegicus</i>
Pomona	Bovino, suíno, gambá
Hardjo	Bovinos
Grippotyphosa	Gambá, guaxinin, ratazana
Australis	Rato, camundongo
Autumnalis	Camundongo
Batavia	Cão, rato, camundongo
Bratislava	Rato, suíno, cavalo
Cynopteri	Morcego
Wolfi	Morcego
Pyrogenes	<i>Rattus norvegicus</i>

Fonte: (Hagiwara et al 2015 – Adaptado)¹⁵

Muitas espécies de animais podem atuar como reservatórios de leptospirosas para outros animais silvestres ou domésticos e mesmo para humanos. Segundo Oliveira, Arsky e Caldas 2013¹⁶ todos os animais são susceptíveis à doença e podem atuar como fonte de infecção.

A doença apresenta distribuição cosmopolita, ou seja, mundial sendo mais prevalente em países com clima tropical e em desenvolvimento, como no Brasil⁸. Neste país, a leptospirose canina é considerada um problema sanitário de grande importância, não somente pela gravidade de sua patogenia, mas também pelo risco potencial de contágio aos seres humanos¹⁷.

No Brasil, a doença é endêmica tornando-se epidêmica em períodos chuvosos que favorecem a ocorrência de enchentes principalmente nas capitais e áreas metropolitanas em períodos chuvosos¹⁸⁻²⁰. Por isso, a

leptospirose é considerada uma doença socioeconômica, acometendo, usualmente pessoas em áreas e condições inadequadas de saneamento básico, com profissões de baixo nível de remuneração, que habitam ou trabalham em locais com más condições de saneamento como os trabalhadores de esgotos, mas também acomete profissionais que estão em constante contato com animais reservatórios da doença como os agricultores, pecuaristas, laboratoristas, veterinários, açougueiros e os de limpeza pública^{19,21}.

Na uma revisão sobre leptospirose canina no Brasil, realizada por Hagiwara et al em 2015¹⁵ foi constatada uma diferença no perfil epidemiológico da leptospirose canina entre as regiões brasileiras estudadas. Nas regiões Sul e Sudeste observou maior frequência de reagentes para os sorogrupos Canicola, Pyrogenes, Copenhageni, enquanto no Norte e Nordeste observou maior frequência de sorovares Autumnalis, Canicola, Grippytyphosa. Essa variação provavelmente está relacionada à existência de reservatórios e exposição dos cães ao risco de infecção.

No município de São Paulo, Santa Rosa et al. (1970)² investigaram a leptospirose em 426 cães durante nove anos. O método utilizado foi o de soroaglutinação microscópica (SAM) com uma coleção de 17 sorovares de leptospirosas: Copenhageni, Canicola, Pomona, Grippytyphosa, Guidae, Sawajizak, Wolffi, Australis, Bataviae, Brasiliensis, Castellonis, Panama, Pyrogenes, Javanica, Autumnalis, Butembo e Patoc. Das amostras analisadas 14% foram reagentes, com títulos que variaram de 200 a 12.800 e nestas o sorovar Icterohaemorrhagiae com 75% foi o que mais prevaleceu. Houve, também, evidências sorológicas para os sorovares Canicola com 13,33%, Sejroe com 3,33%, e com 1.66% os sorovares Pomona, Tarassovi, Australis, Bataviae e Pyrogenes.

1.4. Transmissão

A transmissão da leptospirose pode ocorrer de forma direta ou indireta. A forma direta ocorre, geralmente pelo contato com sangue ou urina de animais infectados, por transmissão venérea, placentária, pele ou mucosa, e a forma indireta, ocorre por meio da exposição dos susceptíveis á ambientes contaminados²².

Dentre os animais domésticos urbanos, o cão, pelo seu hábito domiciliar, e pelo fato de viver em contato direto com o homem, tem sido identificado como elemento importante na transmissão da leptospirose ao homem⁸. Dentre estes, os que vivem em áreas urbanas, em condições sanitárias e de infraestrutura precárias, junto a lixões, esgotos a céu aberto, depósitos de materiais descartados, restos alimentares e com contato com outras espécies animais, apresentam maior risco de adquirirem a leptospirose²³.

1.5. Patogenia

A patogenia da leptospirose é considerada complexa, pois está relacionada a fatores como virulência do sorovar infectante localização do micro-organismo e adaptabilidade ao hospedeiro susceptível²⁴.

Após a entrada no hospedeiro, através da pele ou mucosas, as leptospiros são expostas ao sistema inato de defesa que geralmente desarmam e removem as estirpes invasoras saprófitas, mas não das patogênicas. A infecção inicial é seguida pela bacteremia que persiste por um período de uma a duas semanas, após o início da doença aguda. As leptospiros patogênicas interagem com muitos componentes da matriz extracelular do hospedeiro e algumas proteínas como as adesinas e endotoxinas derivadas da membrana externa facilitam que ocorra a invasão e colonização²⁵.

Nesta fase a bactéria se dissemina pela circulação sanguínea e multiplica-se ativamente no endotélio dos vasos, no sistema linfático, líquido e

em diferentes órgãos parenquimatosos (rim, fígado, pulmões, baço, olhos, trato geniturinário e sistema nervoso central), caracterizando o quadro agudo ou sistêmico da doença, denominado leptospiremia^{12,9}.

As lesões nos órgãos são caracterizadas por dano celular considerável mesmo em presença de poucos micro-organismos, sugerindo o envolvimento de fatores tóxicos das espiroquetas e de citocinas inflamatórias produzidas pelo próprio hospedeiro em resposta a invasão bacteriana²⁶.

O período de incubação, até o início dos primeiros sinais clínicos leva de cinco a dez dias. A resposta sérica do hospedeiro ocorre cerca de sete dias pós-infecção, mediante a produção de anticorpos, promovendo o *clearance* das leptospiras no organismo, embora a bactéria possa permanecer em locais de difícil acesso do sistema imune, como nas células dos túbulos renais⁹. Sendo eliminado pela urina, de forma intermitente (leptospiúria), A eliminação renal do micro-organismo ocorre desde 72 horas após a infecção até semanas a meses nos animais domésticos e por toda vida nos roedores²⁷. Durante a leptospiúria a concentração de anticorpos encontra-se reduzida, já que as bactérias, localizadas nos túbulos renais, não estimulam o sistema imune podendo apresentar-se soronegativos quando testados^{12,20,15}.

A colonização renal causa lesões nas células do epitélio tubular e edema do parênquima, com conseqüente diminuição da perfusão renal, o que resulta em insuficiência renal aguda⁹.

No fígado, a presença de leptospiras provoca lesões hepáticas típicas tais como perda da arquitetura tecidual. As leptospiras localizam-se em sinusóides e canálculos biliares, levando à colestase e provocando um aumento de bilirrubina sérica, contribuindo para o quadro de icterícia, seu grau pode variar dependendo da necrose hepática e do sorovar infectante. As toxinas produzidas pelo micro-organismo desencadeiam disfunção hepática causando hepatite ativa crônica^{9,28}.

O dano pulmonar principal na leptospirose ocorre devido às intensas hemorragias intra-alveolares, levando à insuficiência respiratória. Raras

leptospiras são visualizadas nos pulmões o que sugere não ser a ação direta do micro-organismo a causa principal dos acometimentos pulmonares descritos. A presença de imunocomplexos em membranas alveolares de cobaias sugere um processo autoimune como etiologia da hemorragia pulmonar observada na leptospirose. Em casos graves os pulmões apresentam grandes sufusões²⁹.

Devido a multiplicação das leptospiras na parede intestinal, pode-se desenvolver enterite catarral ou catarro-hemorrágica. Ocasionalmente, ocorre uveíte, manifestação crônica resultante da persistência das leptospiras na câmara interior do olho, determinando uma reação de hipersensibilidade tipo III, como consequência da deposição de imunocomplexos nos tecidos. Apesar de incomum, o sistema nervoso central pode ser invadido pelos micro-organismos ocorrendo meningite benigna⁹.

1.6. Manifestações Clínicas

As manifestações clínicas dependem de vários fatores, em especial do hospedeiro e do sorovar que está infectando. Sabe-se que a bactéria está adaptada nos reservatórios primários (roedores, animais silvestres) causando infecções crônicas ou assintomáticas com fraca resposta imune. Por outro lado, nos hospedeiros acidentais, as infecções costumam serem agudas, geralmente mais graves, com elevada resposta imune²⁰.

No início da doença, as manifestações clínicas são inespecíficas e incluem prostração, anorexia, letargia, mialgia ou tremores musculares, febre (39,5 a 40°C), melena e urina de aspecto mais escuro. Com a evolução da doença, os animais apresentam pulso rápido e irregular e êmese (amarelados, com conteúdo biliar)⁹.

A sintomatologia da leptospirose é variável, podendo apresentar-se sob as formas aguda, hiperaguda ou crônica. Os sinais clínicos dependem da idade do animal, imunidade do hospedeiro, fatores ambientais e a virulência do sorovar envolvido. Infecções hiperagudas levam à leptospiremia intensa,

choque, e morte do animal. Nas infecções agudas observam-se a febre, anorexia, vômito, desidratação, poliúria, polidipsia, e relutância ao movimento. Com a progressão do quadro pode surgir oligúria e anúria. Na forma crônica, os sinais clínicos podem não ser evidentes. O animal pode apresentar febre sem motivo aparente e conjuntivite moderada a severa, no entanto, distúrbios renais e hepáticos crônicos podem surgir em consequência da leptospirose^{12,25}.

Como seqüela da hepatite crônica ou fibrose hepática, acarretam as seguintes manifestações clínicas: inapetência crônica, perda de peso, ascite, icterícia e encefalopatia hepática. Tosse e distrição respiratória estão entre as manifestações pulmonares⁹.

Em geral o animal morre por insuficiência renal e uremia. Sintomas gastroentéricos são mais frequentes na forma anictérica causada pelo sorovar Canicola. Nem todos os animais apresentam a forma icterica e nesse caso, torna-se impossível diferenciar a doença daquela causada pelo sorovar Canicola ou outros menos patogênicos¹³.

O sorovar Copenhageni, que está classificado no mesmo sorogrupo ao qual pertence o sorovar Icterohaemorrhagiae também causa no cão e em humanos, a forma icterica e hemorrágica da leptospirose, de evolução grave e muitas vezes, fatal¹³.

Vários autores consideram que os cães infectados pelo sorovar Icterohaemorrhagiae manifestam principalmente lesão em fígado enquanto que na infecção pelo sorovar Canicola, ocasiona maior comprometimento renal^{9,12,13}.

As lesões vasculares e de coagulação se manifestam através de hematêmese, hematoquezia, melena, epistaxe e petéquias³⁰.

A infecção pode também ser assintomática, havendo, no entanto, a eliminação das leptospirosas na urina, por um período variável de tempo¹³.

1.7. Diagnóstico

Clinicamente é possível suspeitar da doença. A confirmação do diagnóstico de leptospirose pode ser realizada por diferentes métodos laboratoriais baseados na detecção direta ou indireta do agente ou do material genético do micro-organismo^{2,11}.

O diagnóstico da leptospirose consiste em detectar a bactéria ou o seu material genético no sangue, na urina ou tecidos do animal infectado (diagnóstico direto) ou pela detecção de anticorpos (diagnóstico indireto). Pode – se visualizar o micro-organismo na urina através da microscopia de campo escuro ou de contraste de fase, mas devido à liberação intermitente de um pequeno número de micro-organismos, esses procedimentos podem ocasionar em um resultado falso negativo¹¹.

O micro-organismo pode ser cultivado a partir da urina coletada por cistocentese, visando diminuir os riscos de contaminação, sangue ou preferencialmente dos tecidos renal ou hepático. O PCR pode ser usado para demonstrar a presença de micro-organismo na urina, sangue ou tecidos¹¹.

A maioria dos casos de leptospirose é diagnosticada por sorologia. O teste de referencia preconizado pela Organização Mundial de Saúde é o teste da soroaglutinação microscópica (SAM), onde antígenos de leptospiras são colocados com amostras de soro do suspeito e examinados em microscopia de campo escuro para verificação de aglutinação. Os antígenos utilizados devem conter pelo menos um representante por sorogrupo e se possível conter estirpes locais¹¹.

1.7.1 Diagnósticos diferenciais

Devido ao quadro polissistêmico, diferentes doenças devem ser levadas em consideração no diagnóstico diferencial da leptospirose canina, como intoxicações por dicumarínico, babesiose, erlichiose, neoplasias hepáticas e anemias autoimunes⁹.

1.8. Prognóstico

O prognóstico é favorável nos casos tratados com antimicrobianos apropriados e fluidoterapia de modo intensivo e precoce. A leptospirose é uma das afecções em que a sobrevivência pode alcançar até 80% nos casos submetidos à hemodiálise, pois as lesões renais causadas pelas leptospiras não comprometem a regeneração dos néfrons. Constituem exceção aqueles casos em que existem complicações respiratórias. A melhora clínica está associada ao gradual retorno das concentrações séricas de uréia e de creatinina aos valores de referência em dez a quatorze dias. As concentrações de bilirrubina também retornam aos valores de referência, indicando a depuração das leptospiras do parênquima hepático. A trombocitopenia resolve-se espontaneamente ou depois de iniciada a terapia antibacteriana²⁶.

1.9. Tratamento

O tratamento deve ser baseado na gravidade da infecção, na presença ou não de disfunção renal ou hepática e das demais complicações sendo necessária a terapia de suporte na maioria dos casos³¹. Devido ao comprometimento renal observado em grande parte dos casos, deve-se instituir uma fluidoterapia intensa a fim de obter diurese³².

O uso de antibióticos inibe a multiplicação dos micro-organismos reduzindo complicações. Vários antibióticos podem ser utilizados na eliminação da leptospiremia como penicilina, ampicilina, amoxicilina. Estudos mais recentes têm demonstrado alta eficácia da doxiciclina que é considerada o antibiótico de escolha pelo grupo de Estudos sobre leptospirose do American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM), que elaborou e publicou o relatório Consensus Statement on Leptospirosis³³.

O uso precoce deste antibiótico é recomendado por promover rápida eliminação das leptospiras do tecido renal e assim, a condição de portador renal. A hemodiálise pode aumentar a probabilidade de sobrevivência nos cães com insuficiência renal oligúrica ou anúrica²⁶.

1.10. Profilaxia

Nos cães, a vacinação é um importante método de controle, mas as medidas sanitárias gerais, como o controle de roedores, limpeza do ambiente, com a remoção dos resíduos sólidos e líquidos, a restrição de acesso à rua, especialmente nos períodos de maior precipitação pluviométrica, em que ocorrem enchentes e formação de coleções líquidas residuais nas quais as leptospiplas permanecem viáveis por um período maior de tempo, são medidas importantes para reduzir as chances de contaminação e infecções³⁴.

Para os humanos, como medidas de prevenção, deve-se evitar o contato com água ou lama que possam estar contaminadas pela urina de roedores, pessoas que trabalham na limpeza de lama, entulhos e desentupimento de esgoto devem usar botas e luvas de borracha. Medidas ligadas ao meio ambiente, tais como o controle de roedores, obras de saneamento básico (abastecimento de água, lixo e esgoto) e melhorias nas habitações humanas são medidas preventivas importantes³⁴.

Com relação às vacinas empregadas no controle da leptospirose animal, a imunidade conferida a um sorovar é restrita aos sorovares homólogos ou antigenicamente muito próximos, portanto é sorovar-específica, não conferido proteção cruzada, perdendo sua eficácia em relação a outros sorovares^{8,11}, por isso a necessidade de vacinas polivalentes para a leptospirose. Porém, parece existir certo grau de reatividade cruzada entre os diferentes sorogrupos. Isto pode ser observado pelas reações cruzadas entre alguns sorovares, quando se procede à reação de aglutinação microscópica. Também foi demonstrado *in vivo* que existe uma proteção entre algumas estirpes virulentas de *Grippotyphosa*, *Icterohaemorrhagiae*, *Canicola* e *Pomona*¹³.

A proteção promovida por LPS de leptospiplas é completa para os sorovares homólogos e apenas parcial para os sorovares heterólogos' por isso, as vacinas não são eficazes quando um novo sorovar é introduzido em uma dada população animal^{35,36}. Tabata et al. (2002)³⁷, demonstraram haver certo grau de proteção cruzada entre os sorovares Hardjo, Wolffi e Guaricura pertencentes ao sorogrupo Sejroe. O efeito de proteção cruzada é

compartilhado por antígenos não LPS de pelo menos três sorogrupos (Canicola, Icterohaemorrhagiae e Autumnalis). As frações LPS protegem contra os desafios homólogos, mas não contra os desafios heterólogos, enquanto o extrato proteico total bacteriano induz significativa proteção contra ambos os tipos de desafio, indicando que a proteção cruzada entre os sorovares está relacionada às proteínas da membrana externa^{38,39}.

As vacinas induzem a formação de anticorpos aglutinantes que podem dificultar a interpretação dos resultados do teste de SAM nos casos em que há suspeita de leptospirose, entretanto, são em geral títulos baixos. Na maior parte das vezes, o título de anticorpos praticamente torna-se nulo em três a nove meses após a vacinação⁴⁰. Acredita-se que a imunidade pós-vacinal também seja curta, e por isso recomendando-se doses de reforço a cada seis meses para os animais que estão altamente expostos ao risco da infecção. Segundo Klaasen (2003)⁴¹ não se conhece ao certo a duração da imunidade dada pelas vacinas.

As vacinas tetravalentes podem resultar na formação de anticorpos reagentes aos antígenos vacinais e a antígenos do sorogrupo Bratislava e Autumnalis, não incluídos nas vacinas. Recomenda-se interpretar os títulos de SAM pareados em conjunto com histórico vacinal nos casos de diagnóstico individual¹⁵.

Atualmente, as vacinas presentes no mercado protegem contra o desenvolvimento da doença, mas nem sempre previnem contra instalação das leptospirosas no rim. Nessas condições o cão não adoece, mas apresenta leptospiúria por algum tempo, na dependência do sorovar e da resistência do cão. O cão torna-se um portador, condição essa que somente pode ser resolvida com o uso de antibióticos⁴⁰.

Outra forma de prevenção é o controle populacional de cães, pois o crescimento desta população aumenta o risco de transmissão de zoonoses como a leptospirose. Cães considerados errantes ou a posse não responsável dos mesmos possuem 3,59 vezes mais risco de se infectar com esta enfermidade pelo fato de não serem vacinados contra leptospirose, por

formarem grupos quando as fêmeas se encontram no cio, pela exposição à água empoçada e pelo hábito de revirar lixos que podem estar contaminados com a urina de roedores ou animais infectados⁴².

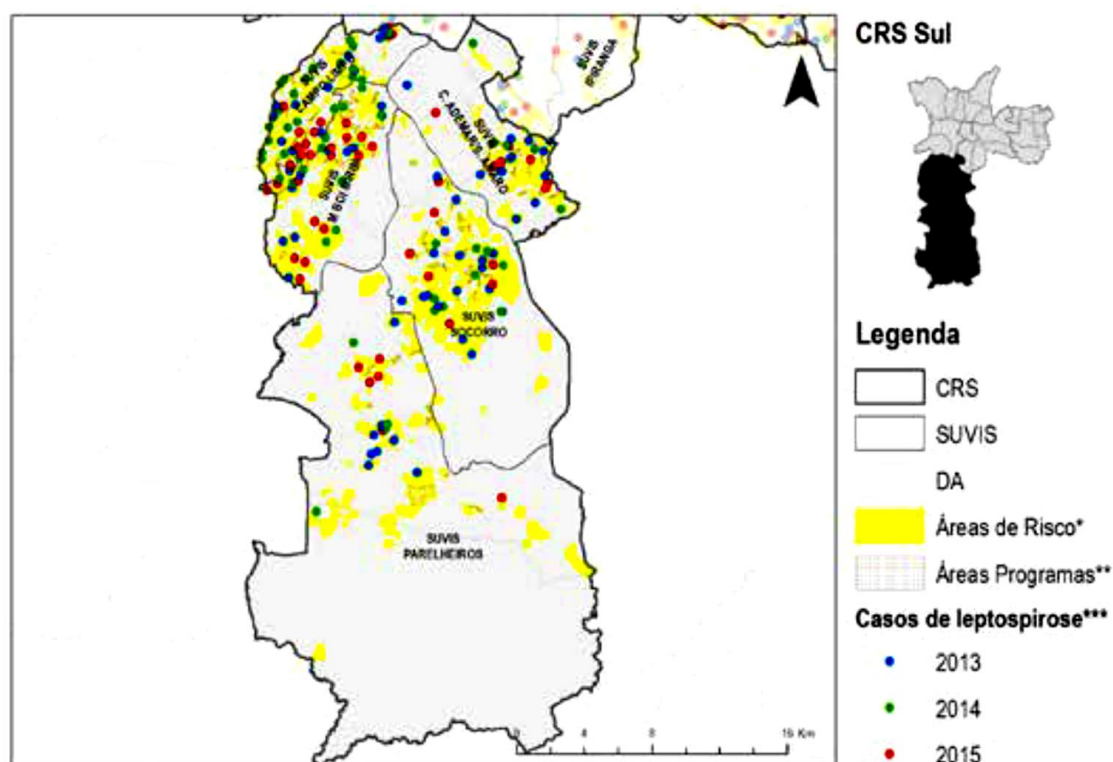
No município de São Paulo o controle populacional de cães é realizado por meio de mutirões de esterilização cirúrgica, gratuitos realizados pela prefeitura de São Paulo, desde 2010. Organizados pelas Vigilâncias Ambientais das Supervisões de Vigilância em Saúde (SUVIS), unidades de atenção em saúde do município de São Paulo, em conjunto com as organizações não governamentais (ONGs)⁴³.

Estes mutirões de esterilização são realizados de maneira constante em áreas prioritárias do município, sendo estas áreas definidas a partir de critérios epidemiológicos para os distritos administrativos.

2. JUSTIFICATIVA

As áreas de abrangência da Supervisão de Vigilância em Saúde (SUVIS) de Parelheiros e SUVIS Capela do Socorro possuem características socioculturais e ambientais que possibilitam a circulação de vários agentes infecciosos (Figura 2). Essa situação, associada ao aumento de animais portadores de agentes patogênicos, como a proliferação de roedores, constitui elevado risco de infecção animal, humana e ambiental⁴⁴. Nessas regiões ocorrem a interação de aglomerados urbanos com uma grande quantidade de áreas verdes, remanescentes da Mata Atlântica, de manancial, representada pelas represas de Guarapiranga e *Billings*, (Figura 3) e de animais silvestres, o que propicia o contato da população humana e de animais domésticos com a vida silvestre. O perfil epidemiológico da leptospirose está estreitamente associado à paisagem e a circunstâncias que envolvem alterações desordenadas do sistema ecológico, provocadas pela penetração do homem em novos ecossistemas com conseqüente disseminação a novas áreas e hospedeiros⁴⁵.

Figura 2 - Áreas Programas e Áreas de Altíssimo Risco para a Leptospirose no Município de São Paulo (2013 - 2015).



Legenda: CRS (Coordenadoria Regional de Saúde); SUVIS (Supervisão de Vigilância em Saúde); DA (Distrito Administrativo); * (Áreas de altíssimo e alto risco de ocorrência de leptospirose); ** (Áreas priorizadas para as ações de controle da população de roedores); *** Casos confirmados de leptospirose humana.

Fonte: (COVISA 2016)⁴⁶.

Figura 3 – Ilha do Bororé, bairro localizado no extremo sul da cidade de São Paulo cercado pela Represa Billings, situado na área de abrangência SUVIS Capela do Socorro.



Fonte: (Secretaria do Governo Municipal, São Paulo – 2016)⁴⁷.

Estudos realizados em outras regiões brasileiras demonstraram a ocorrência de doenças de animais domésticos, silvestres e de zoonoses, resultantes dessa interação, portanto utilizaremos o cão doméstico, atendido em campanhas de esterilização cirúrgica, como evento sentinela para realizar um estudo soro epidemiológico de leptospirose no extremo Sul do município de São Paulo.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo Principal

Estudar os fatores de risco associados à leptospirose em cães atendidos em campanhas de esterilização cirúrgica realizadas nas áreas de abrangência da Supervisão de Vigilância em Saúde de Parelheiros e da Supervisão de Vigilância em Saúde da Capela do Socorro, localizadas no extremo Sul do município de São Paulo.

3.2 Objetivo Secundário

- a) Investigar por meio de inquérito soro epidemiológico a ocorrência de leptospirose na população canina estudada;
- b) Identificar os sorovares de *Leptospiras* spp. mais frequentes na população canina estudada;
- c) Identificar os possíveis fatores de risco associados à leptospirose canina;
- d) Contribuir com os estudos dos sorovares mais prevalentes no Brasil, para a espécie canina;

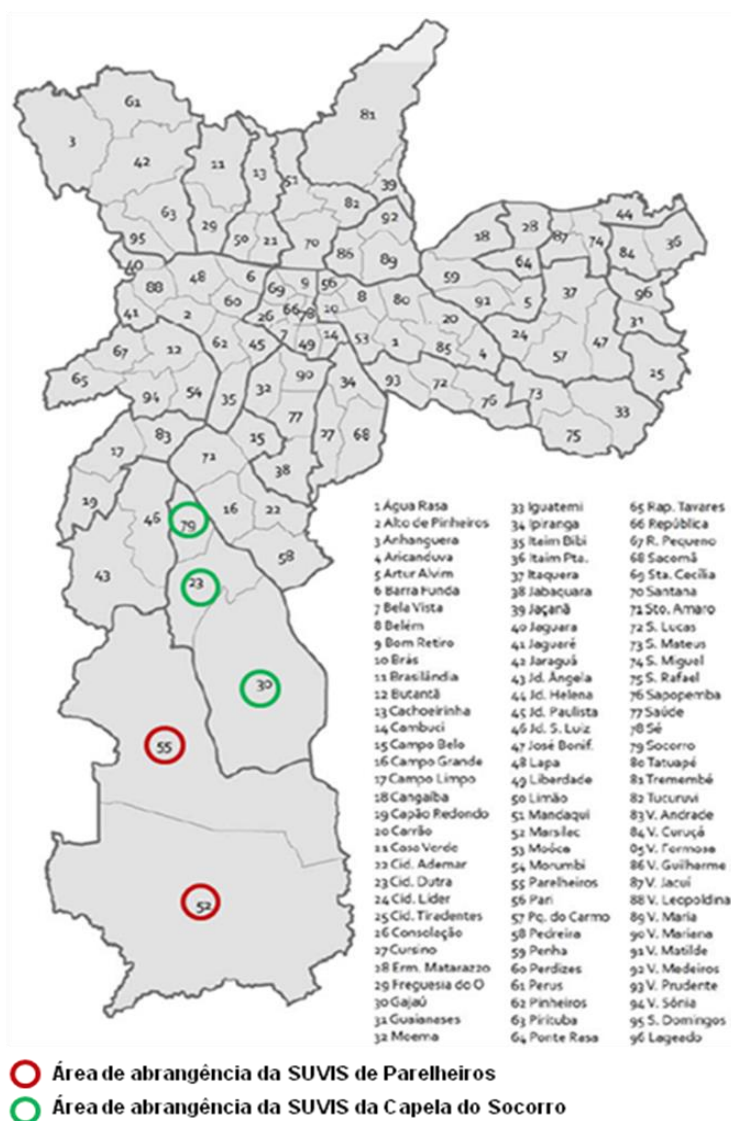
4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos foram autorizados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNISA, parecer nº 80/2015.

4.1 População alvo

Foram utilizados 198 cães atendidos em campanhas de esterilização cirúrgica realizadas na área de abrangência da Supervisão de Vigilância em Saúde de Parelheiros e da Supervisão de Vigilância em Saúde da Capela do Socorro, localizadas no extremo Sul do município de São Paulo, SP. A Figura 4 mostra a divisão do município de São Paulo em distritos administrativos, sendo que as linhas espessas representam as SUVIS e suas áreas de abrangência.

Figura 4 – Divisão do município de São Paulo em distritos administrativos. Os círculos verdes representam as áreas de abrangência da SUVIS de Parelheiros e os círculos vermelhos as áreas de abrangência da SUVIS Capela do Socorro – São Paulo, 2016.



Fonte: (Adaptado de IBGE – São Paulo, 2000)⁴⁸.

4.2 Colheita de material Biológico

As 198 amostras foram colhidas com o consentimento dos proprietários de cada animal, sendo todos os procedimentos submetidos à autorização por escrito através do Termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE A).

As colheitas de sangue foram efetuadas por venopunção da jugular, utilizando seringas descartáveis de 5mL e agulha 30x7 mm. Após as colheitas, tais amostras foram mantidas em temperatura ambiente e posteriormente centrifugadas para a obtenção do soro, que foi aliquoteado e armazenado a – 20°C para posterior realização do diagnóstico sorológico da infecção por *Leptospira* spp.

4.3 Fatores de risco associados à leptospirose - Questionário Epidemiológico

Os proprietários dos cães responderam um questionário (APÊNDICE B) a respeito dos fatores de risco relacionados à leptospirose canina que possam aumentar a probabilidade de contato dos cães com o agente causador da leptospirose.

4.4 Teste de Soroaglutinação microscópica (SAM)

A técnica SAM aplicada ao diagnóstico da leptospirose foi realizada no Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Departamento de Medicina Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP).

Para o diagnóstico sorológico da infecção por *Leptospira* spp. foi utilizada a técnica de SAM com uma coleção de antígenos vivos constituídos por 24 sorovares de leptospiros, como descrito no Quadro 2. As culturas vivas de leptospiros foram mantidas em meio líquido de EMJH modificado com

quatro a 14 dias de crescimento e uma densidade aproximada 100 a 200 micro-organismos por campo microscópico, com aumento de 400 vezes^{49,50, 51}.

Os soros foram diluídos a 1:50 em solução salina tamponada de Sorensen. A reação foi efetuada em microplacas de poliestireno com 96 poços, utilizando-se um volume de 50µL de antígeno, obtendo-se a diluição final da mistura soro/antígeno 1:100. Os soros reagentes na triagem foram titulados em uma série de diluições geométricas de razão dois. O título do soro foi a recíproca de maior diluição que apresentou 50% de leptospiras aglutinadas. As placas foram incubadas em temperatura ambiente por três horas. As leituras foram realizadas em microscópio de campo escuro, no aumento de 100 vezes, observando-se a formação de aglutinação⁴⁹.

Quadro 2 - Relação dos sorovares de leptospiras utilizados como antígenos na reação de SAM aplicada ao diagnóstico de leptospirose – São Paulo -2016.

Espécie	Sorogrupo	Sorovar	Estirpe
<i>L.interrogans</i>	Australis	Australis	Ballico
		Bratislava	Jez Bratislava
	Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A
		Butembo	Butembo
	Ballum	Castellonis	Castellon 3
	Bataviae	Bataviae	Van Tienen
	Canicola	Canicola	Hond Utrcht IV
	Celledoni	Whitcombi	Whitcombi
<i>L. kirschneri</i>	Cynopteri	Cynopteri	3522C
	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskova V
<i>L.interrogans</i>	Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis
	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	M-20
		Icterohaemorrhagiae	RGA
	Javanica	Javanica	Veldrat Bat 46
	Panama	Panama	CZ 214k
	Pomona	Pomona	Pomona
	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
	Sejroe	Hardjo	Hardjoprajitno
		Wolffi	3705
	Shermani	Shermani	LT 821
Tarassovi	Tarassovi	Perepelicin	
<i>L.santarosai</i>	Sejroe	Guaicura	Senhot
<i>L.biflexa</i>	Andamana	Andamana	CH 11
	Seramanga	Patoc	Patoc - 1

5. RESULTADOS

5.1. Resultados Sorológicos

Para a caracterização do sorovar mais provável pela técnica de SAM, levou-se em consideração a titulação e a frequência. O animal que apresentou reação para dois ou mais sorovares foi considerado soro reagente para o sorovar de maior título. Das 198 amostras de soro canino analisadas, 20 foram reagentes pela técnica de SAM com títulos entre 100 a 6.400, obtendo-se uma prevalência de 10,1% vista no Gráfico 1. O sorovar Butembo foi o mais prevalente 25% (5/20), seguido do sorovar Grippothyphosa com 20% (4/20) e os demais sorovares Copenhageni, Icterohaemorrhagiae e Canicola com 10% (2/20) cada, Pomona e Guaicura com prevalência de 5% (1/20) cada, observado no Gráfico 2.

No Quadro 3 é apresentado o número de amostras de soro de cães reagentes pela técnica de SAM aplicada à leptospirose de acordo com os sorovares e seus respectivos títulos.

Gráfico 1 – Prevalência de reagentes contra *Leptospira* spp. em São Paulo, 2016.

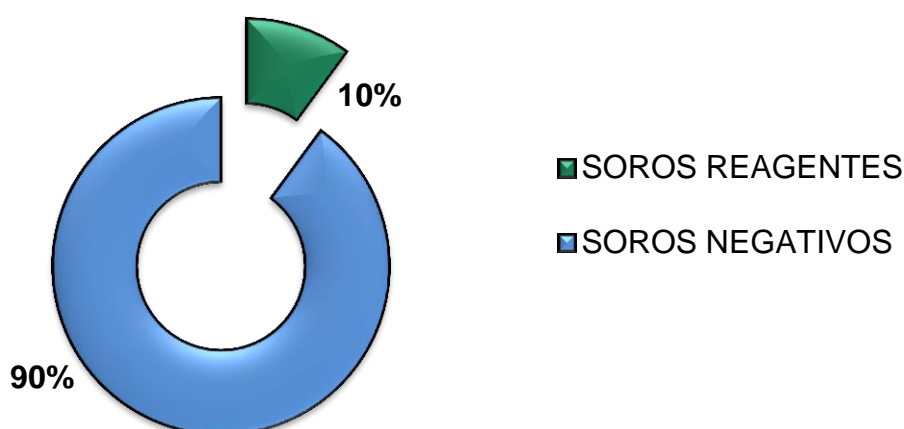
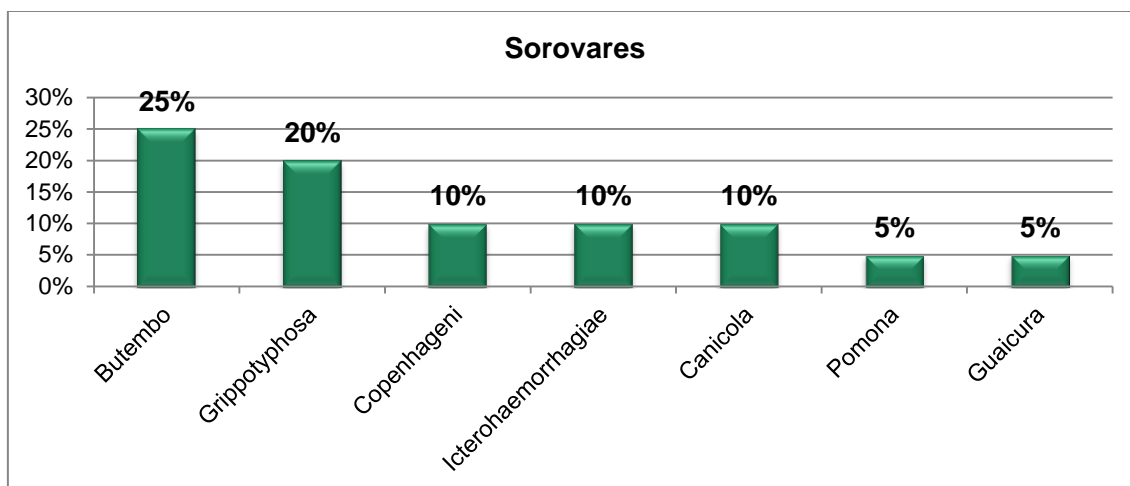


Gráfico 2 - Sorovares identificados em 198 amostras de soro de cães da zona Sul do município de São Paulo, SP pela técnica SAM aplicada à leptospirose – São Paulo, 2016.



Quadro 3 - Frequência de aglutininas antileptospiras em 198 amostras de soro de cães da zona Sul do município de São Paulo, SP reagentes pela técnica de soroaglutinação microscópica aplicada à leptospirose, segundo o sorovar e seus respectivos títulos – São Paulo, 2016.

SOROVAR	Título						Total (%)
	100	200	400	800	1600	6.400	
Copenhageni	1			1			2 (10%)
Butembo	1	3			1		5 (25%)
Grippothyphosa	1		3				4 (20%)
Icterohaemorrhagiae			2				2 (10%)
Pomona	1						1 (5%)
Guaicura						1	1 (5%)
Canicola	1		1				2 (10%)

5.2. Fatores de risco associados à leptospirose

A distribuição do número de cães e a soropositividade para a leptospirose, segundo as variáveis estudadas e a probabilidade de ocorrência ao acaso (P) são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição de variáveis analisadas como possíveis fatores de risco para leptospirose em 2016 em cães da zona Sul do município de São Paulo no período de agosto de 2015 a julho de 2016.

Variáveis	Categorias	Nº. de cães amostrados	Nº. de cães positivos (%)	P
Sexo	Macho	65	6 (9,2)	0,939
	Fêmea	129	10 (7,8)	
Vacinação	Não	89	5 (5,6)	0,224
	Sim	93	11 (11,8)	
Contato com área	Não	153	11 (7,2)	0,247
	Sim	27	4 (14,8)	
Acesso à rua	Não	87	4 (4,6)	0,144
	Sim	94	11 (11,7)	
Presença de rio	Não	104	8 (7,7)	0,948
	Sim	77	7 (9,1)	
Terreno baldio	Não	109	10 (9,2)	0,797
	Sim	72	5 (6,9)	
Região de mata	Não	80	7 (8,8)	1,000
	Sim	100	8 (8)	
Esgoto a céu aberto	Não	148	14 (9,5)	0,459
	Sim	30	1 (3,3)	
Presença de ratos	Não	43	0 (0)	0,023
	Sim	136	15 (11)	
Hábito de caça	Não	89	4 (4,5)	0,111
	Sim	90	11 (12,2)	
Nº. de cães no	Até 3	135	9 (6,7)	0,202
	> 3	43	6 (14)	
Contato com outros	Não	75	6 (8)	1,000
	Sim	102	9 (8,8)	
Potes recolhidos a	Não	126	9 (7,1)	0,483
	Sim	51	6 (11,8)	
Contato com outros	Não	89	9 (10,1)	0,745
	Sim	80	6 (7,5)	

A única variável associada à infecção foi a presença de ratos ($p = 0,023$). Em cães de proprietários que referiram a presença de ratos no domicílio a frequência foi de 11%. Não houve associação estatística significantes com os demais fatores de risco analisados.

6. DISCUSSÃO

Na região sul do município de São Paulo, o estudo soro epidemiológico referente à leptospirose canina, demonstrou que a doença é endêmica com prevalência de 10,10%, resultado dentro do esperado segundo a revisão realizada por Hagiwara et al, (2015)¹³ dos trabalhos publicados entre 2003 e 2013 sobre a ocorrência de leptospirose canina no Brasil que relataram uma soroprevalência de 7,15% a 48,2%.

Diferentes sorovares de leptospiras são associados com um ou mais hospedeiros mantenedores que servem de reservatórios de infecção. Foram encontradas reações sorológicas predominantes para sorovares Butembo e Grippothyphosa considerados acidentais para cães⁵³. Segundo Aguiar et al., (2007)⁵⁴, os diferentes sorovares encontrados têm sido relacionadas com o meio ambiente e as espécies que coabitam com os cães.

Tonin, et al (2010)⁵⁵ constataram o aumento na prevalência do sorovar Butembo de 8.36% em bovinos no Estado de Santa Catarina. Lilenbaum (1996)⁵⁶ considera que possivelmente a transmissão ocorra devido ao contato dos animais com ambientes contaminados por leptospiras provenientes de animais silvestres e roedores. Oliveira et al (2013)⁵⁷ encontraram este sorovar no Pantanal Sul Mato-Grossense em estudo realizado com animais silvestres no veado campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) e Lenharo et al (2012)⁵⁸ identificaram o sorovar Butembo dentro do Parque Zoológico Municipal de Bauru em roedores.

A ocorrência do sorovar Grippothyphosa cujos hospedeiros mantenedores são as espécies silvestres, reforça o risco de uma possível transmissão ou inserção de leptospiras patogênicas no meio.

Em cães, o sorovar Butembo foi encontrado por Blazius et al (2005)⁵⁹ na região de Itapema em Santa Catarina, com frequência de 10,4% e Grippothyphosa com 11,1% em Patos Paraíba a ocorrência foi de 7,5% para Butembo e 10% Grippothyphosa¹. No entanto, percentuais inferiores desses sorovares, 0,73% e 1,47% respectivamente, foram encontrados em Botucatu por Lopes et al (2005)⁶⁰.

Destaca-se também, a ocorrência, porém com menor frequência (10%) do sorovar Canicola tradicionalmente associado com leptospirose canina, e dos sorovares Copenhagen e Icterohaemorrhagiae, pertencentes ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae responsáveis pelas formas mais graves da leptospirose humana e canina. Sorovares também encontrados no trabalho de Tesseroli et al (2008)⁶¹ com uma frequência de 86% para Copenhageni e 2,6% Icterohaemorrhagiae em Curitiba Paraná. Fernandes et al (2013)⁶² destacou a prevalência de 20% para o sorovar Copenhageni em Natal Rio Grande do Norte e Azevedo et al (2011)⁶² 1,4% para Icterohaemorrhagiae em Patos, Paraíba.

Essa menor frequência dos sorovares Canicola, e Icterohaemorrhagiae pode estar relacionado a presença destes na formulação da maioria das vacinas antileptospirose. As vacinas polivalentes como a óctupla (V8) é composta pelos sorovares Canicola e Icterohaemorrhagiae, déctuplas (V10) com quatro sorovares, além dos sorovares presente na V8 acrescenta Pomona e Grippothyphosa, a undéctupla (V11) com cinco sorovares já citados e acrescido do sorovar Copenhageni⁶⁴. A utilização extensiva dessas vacinas na Europa e nos Estados Unidos diminuiu consideravelmente os casos de leptospirose causados por esses sorovares. Em contrapartida, outros sorovares passaram a ser detectados no cão, como consequência do contato do cão com os reservatórios (animais silvestres) ou com o meio contaminado, onde vivem os portadores naturais, como aconteceu com o presente estudo que identificou a presença do sorovar Butembo sendo prevalente¹³.

Foi possível à confirmação do diagnóstico de leptospirose em um animal (5%) classificado como não reagente pela coleção de antígenos de referência a qual é constituída de isolados de diferentes ecossistemas e distribuída pela

OMS. O sorovar detectado foi o Guaicura (estirpe M-04), estirpe autóctone, isolada de búfalos do Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. Este fato destaca a importância da inclusão de estirpes de leptospira, isoladas dos locais onde há ocorrência de casos em levantamentos sorológicos, geralmente realizados apenas com antígenos de referência. Essa inclusão é justificada pelo aumento na especificidade e sensibilidade do teste de SAM, devido à particularidade antigênica entre as estirpes de leptospira patogênica. Sarmiento (2012)⁶⁵ utilizou estirpes de leptospiros isolados no Brasil, na SAM aplicada ao diagnóstico da leptospirose em rebanhos bovinos de oito estados brasileiros, sendo que o sorovar Guaicura ocupou posição de destaque como sorovar mais provável em cinco estados (São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso).

Analisando-se uma possível associação entre a frequência de animais reatores para a leptospirose e as variáveis apresentadas no questionário, só foi observada significância estatística nos cães de proprietários que reportaram a presença de roedores, ou seja, o contato com roedores é um fator de risco para a infecção.

7. CONCLUSÃO

Nas condições do presente estudo os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

- A prevalência de cães sororreagentes para *Leptospiras* spp. na região Sul do município de São Paulo, foi de 10,10%

- Os sorovares de *Leptospiras* spp. predominantes nos cães da região Sul do município de São Paulo, foram em ordem decrescente Butembo, Grippothyphosa, Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, Canicola, Pomona e Guaicura.

- A inclusão da estirpe autóctone Guaicura, propiciou a confirmação do diagnóstico de leptospirose a confirmação do diagnóstico em um animal (5%) classificado como não reagente pela coleção de antígenos de referência composto por antígenos não autóctones.

- A variável presença de roedores ($p = 0,023$) foi a única identificada como fator de risco associado à sororeatividade para leptospirose.

Os dados do inquérito sorológico apresentados no presente trabalho servem como um alerta em relação ao potencial zoonótico da leptospirose canina e reforçam a necessidade de programas de controle da população de cães, através do controle da reprodução e estímulo da posse responsável e também importância de um melhor saneamento básico oferecido a região.

REFERÊNCIAS

1. Batista CSA, Azevedo SS, Alves CJ, Vasconcellos AS, Moraes ZM, Clementino IJ, et al. Soroprevalência de leptospirose em cães errantes da cidade de Patos, Estado da Paraíba, Brasil. *Jornal Brasileiro de Veterinária Revista Animal e Ciência*. 2004 (41): 131-136p.
2. Santa Rosa CA, Castro AFP, Silva ASS, Teruxa JM. Nove anos de leptospirose no Instituto biológico de São Paulo. *Revista Instituto Adolfo Lutz*. 1969 (29/30): 19 – 28p.
3. Kogika MM, Hagiwara MK, Mirandola RMS. Alterações bioquímicas na leptospirose canina. *Braz. J. vet. Res. anim. Sei.*, São Paulo, 1990 (2): 177-182p.
4. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa Nº 50, de 24 de setembro de 2013.
5. Alves CJ, Andrade JSL, Vasconcellos AS, Moraes ZM, Azevedo SS, Santos FA. Avaliação dos níveis de aglutininas anti-leptospira em cães no município de Patos- PB, Brasil. *R. bras. Ci. Vet* 200 (7): 17 – 21p.
6. Adler B, *Leptospira and Leptospirosis*. 1ªEd. Austrália Springer, 2015. 295p.
7. Smithe, L. et al. Classification of leptospiral genomospecies 1,3,4 and 5 as *Leptospira alstonii* sp. nov., *Leptospira vanthielii* sp. nov., *Leptospira terpstrae* sp. nov., *Leptospira yanagawae* sp. nov., respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2013 (63), n.5, 1859-1862p.
8. Levett PN. Leptospirosis. *Clinical microbiology reviews*. 2001 (14) 296–326p.

9. Megid J. Ribeiro MG Paes AC. Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia. 1^oed. Rio de Janeiro: Roca. 2016. 376p.
10. Higino SSS. Caracterização Epidemiológica da Leptospirose em Caprinos Leiteiros no Semiárido da Paraíba, Brasil [tese]. Patos: Universidade Federal de Campina Grande. 2012. 69p.
11. Faine S. Adler B. Bolin C. Perolat P. *Leptospira* and Leptospirosis. 2^a ed. Melbourne, Australia: MediSci, 1999. 272p.
12. Corrêa WM. Corrêa CNM. Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos. 2^a ed. Rio De Janeiro: Medsi, 1992. 396p.
13. Hagiwara MK. Leptospirose canina. Boletim técnico Pfizer Saúde Animal. 2003. 1-6p.
14. Mohammed H, Nozha C. Hakim K. Abdlaziz F. Reikia B. *Leptospira*: Morphology, Classification and Pathogenesis. Bacteriol Parasitol 2011 (2): 120p.
15. Hagiwara MK, Miotto BA. Tozzi BF. Revisão sobre leptospirose canina no Brasil. Revista Clínica Veterinária 2015;(104): 86p.
16. Oliveira SV, Arsky MLNS. Caldas EP. Reservatórios animais da leptospirose: Uma revisão Bibliográfica. Saúde Santa Maria 2013 (39): 20p.
17. Acha PN, Szyfres B. Zoonosis y Enfermedades transmisibles Comunes al Hombre y a los Animales. Organización Panamericana de la Salud. 3^a ed. Washington 2003. 397p. Publicación Científica Técnica N^o580.
18. Maciel EAP, Carvalho ALF. Nascimento SF. Matos RB. Golveia EL. Reis MG. Ko A. Household transmission of *Leptospira* infection in urban

- slum communitis. PLOS Neglected Tropical Diseases. PLOS Neglected Tropical Diseases. 2008 (2): 5p.
19. Brasil. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Leptospirose: Diagnóstico e Manejo Clínico. Ministério da Saúde, Secretária de Vigilância em Saúde, 2009, 34p.
 20. Pelissari DM. Maia-elkhoury ANS. Arsky, MLNS. Nunes ML. Revisão sistemática dos fatores associados à leptospirose no Brasil, 2000-2009. Epidemiologia e serviços da saúde. Brasília 2011 (20): 565-574p.
 21. Vasconcellos SA. Leptospirose animal. In: Encontro nacional em Leptospirose. Rio de Janeiro. Anais Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Nacional de Saúde. 1993. 62-65p.
 22. Greene CE. Miller MA. Brown CA. Leptospirosis. In: Greene CE. Infectious diseases of the Dog and Cat. 2ªed Philadelphia: W. B. Saunders. 1998. 273-281p.
 23. Genovez ME. Leptospirose em cães. Pet Veterinária 1996 (1): 8-9p
 24. Pinna MH, Orià AP, Cypriano GB, Oliveira FS, Almeida DS, Pinheiro AC et al. Leptospirose em cães. PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia. Londrina 2010 (4): 24p.
 25. Gomes MJP. Gênero *Leptospira* spp. [tese] FAVET –UFRGS 2013. 51p.
 26. Jericó MM. Neto JP. Kogika MM. Tratado de Medicina Interna de Cães e Gatos. 1ªed. Roca 2014 2464p.
 27. Gírio RJS. Pereira FLG. Filho MM. Mathias LA. Herreira RCP. Alessi AC. Pesquisa de anticorpos contra *Leptospira* spp. Em animais silvestres e

- em estado feral da região de Nhecolândia, Mato Grosso do Sul, Brasil. Utilização da técnica de imuno-histoquímica para detecção do agente. *Ciência Rural*, Santa Maria 2004 (34): 165-169p.
28. Silva JJP. Clinicopathological and immunohistochemical features of the severe pulmonary form of leptospirosis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2002 (35) n. 4. 395-399p.
29. Nally JE, Chantranuwat C. Wu XY. Fishbein MC. Pereira MM. Pereira JJ. Et al. Alveolar septal deposition of immunoglobulin and complement parallels pulmonary hemorrhage in a guinea pig model of severe pulmonary leptospirosis. *Am. J. Pathol.* 2004 (164): 1115-1127p.
30. Freire IMA, Caracterização de parâmetros bioquímicos para o diagnóstico complementar da leptospirose canina. [Dissertação] (Mestrado em Medicina Veterinária Coletiva) – Universidade Federal Fluminense, 2005.
31. Greene CE, Miller MA. Brown CA. Leptospirosis. In: Greene CE. *Infectious diseases of the Dog and Cat.* 3ªed Saunders Elsevier, St. Louis 2006. 402-417p.
32. Nelson RW, Couto G, *Manual de medicina interna de pequenos animais.* 2ªed. Elsevier. 2006 1128p.
33. Sykes JE, Hartmann K, Lunn KF, Moore GE, Stoddard RA, Goldstein RE. 2010 ACVIM small animal consensus statement on leptospirosis: diagnosis, epidemiology, treatment, and prevention *J Vet Intern Med* 2011 Jan – feb; 25(1): 1-13
34. Schmitt CI. Jorgens EM. Leptospirose em cães: uma revisão bibliográfica [tese] Universidade de Cruz Alta. 2011. 4p.

35. Minke J.M., Bey R., Tronel J.P., Latour S., Colombet G., Yvrel J., Cariou C., Guiot A.L., Cozette V. & Guigal P.M. 2009. Onset and duration of protective immunity against clinical disease and renal carriage in dogs provided by a bi-valent inactivated leptospirosis vaccine. *Vet. Microbiol.* 137:137-145,
36. McBride AJA, Athanzio DA, Reis MG, Ko AI. Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis* 18: 376-386, 2005.
37. Tabata R. Scavini NH. Zuanaze MAF, Oliveira EMD, Dias RA. Moraes ZM. Ito FH. Vasconcellos SA. Cross neutralizing antibodies in hamsters vaccinated with leptospiral bacterins produced with three serovars of serogroup Sejroe. *Braz. J. Microbiol.* (33) 2002. 265-268p.
38. Masuzawa T. Suzuki R. Yanagihara Y. Comparison of protective effects with tetravalent glycolipid antigens and whole cell inactivated vaccine in experimental infection of *Leptospira*. *Microbiology Immunology.* (35) 1991. 199-208p.
39. Sonrier C. Branger C. Michel V. Ruvoënclouet N. Ganière JP. André FG. Evidence of cross-protection within *leptospira interrogans* in an experimental model. *Vaccine.* (19) 2001 86-94p.
40. Langoni H. Pimentel VL. Silva AV. Lucchesi SB. Denardi MB. Avaliação da dinâmica de anticorpos pós-vacinais contra *leptospira spp*, em cães vacinados, pela prova de soroaglutinação microscópica. *Ars veterinária.* (18) 2002. 54-61p.
41. Klaasen HL. Molkenboer MJ. Vrijenhoek MP. Kaashoek MJ. Duration of immunity in dogs vaccinated against leptospirosis with a bivalent inactivated vaccine. *Veterinary Microbiology.* (95) 2003. 121-132p.
42. Magalhães DF, Silva JA, Moreira CE, Wilke VML, Nunes ABV, Haddad JPA, et al. Perfil dos cães sororreagentes para aglutininas anti-

- Leptospira interrogans em Belo Horizonte, Minas Gerais, 2001/2002. Arq brasileiro de Med. Vet. e Zoot (5) 2007 1326-1329p.
43. Gutjahr M, Avaliação do programa de esterilização do município de São Paulo. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada Às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.
44. Querino AMV, Delbem ACB. Oliveira RC. Silva FG. Müller EE. Freire RL. Freitas JC. Fatores de risco associados à leptospirose em cães do município de Londrina-Pr. Seminario: Ciências Agrárias. (24) 2003. 27-34p.
45. Murhekar MV, Sugunan AP. Vijayachari P. Sharma S. Seghal SC. Risk of factos in transmission of leptospiral infection. Indian journal of medical Research. (107) 1998. 218-223p.
46. COVISA. Coordenação de Vigilância em Saúde. Alerta para o maior risco de Leptospirose na estação chuvosa. Prefeitura de São Paulo. Secretária Municipal de Saúde: São Paulo. 2016, 2p.
47. Secretaria do Governo Municipal. GT Parelheiros / Álbum de Fotos Ilha do Bororé. [acesso em 15 nov 2016]. Disponível em: <http://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/governo/gt_de_parelheiros/album_de_fotos/index.php?p=174670&image=3>
48. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Populacional de 2000. Rio de Janeiro: IBGE, 2000. 1CD-ROM.

49. Galton MM, Sulzer CR, Santa Rosa CA, Fields MJ. Application of a microtechnique to the agglutination test for leptospiral antibodies. *Journal of Applied Microbiology*. (13)1995. 81-85p.
50. Cole JR, Sulzer CR, Pulssely PR. Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination. *Journal of Applied Microbiology*. (5) 1973. 976-980p.
51. Alves CJ, Vasconcellos AS, Camargo CRA, Moraes ZM. Influência de fatores ambientais na proporção de caprinos soro-reagentes para a leptospirose em cinco centros de criação do Estado da Paraíba. *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo*. (63) 1995.11-18p.
52. Myers DM. Manual de métodos, para el diagnóstico de laboratorio de la leptospirosis. Martinez: OPAS, Centro Panamericano de Zoonosis, 1985.
53. Moraes ZM, Labruna MB, Camargo LMA, Gennari SM. Fatores de risco associados à ocorrência de anticorpos anti- *Leptospira* spp. Em cães do município de Monte Negro, Rondônia, Amazônia Ocidental Brasileira. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2007 (59) 70-76p.
54. Aguiar DM, Cavalcante GT, Marvulo MFV, Silva JCR, Pinter A, Vanconcellos SA, Moraes ZM, Labruna MB, Camargo LMA, Gennari, SM. Fatores de risco associados à ocorrência de anticorpos anti- leptospira spp. Em cães do município de monte negro, Rondônia, Amazônia ocidental Brasileira. *Arquivos brasileiros de medicina veterinária e Zootecnia*. 2007 (59)70-76p.
55. Tonin AA, Azevedo MI, Escobar TP. Leptospirose bovina: aumento na incidência da leptospira interrogans sorovar butembo no rebanho do estado de Santa Catarina, Brasil. *Acta Veterinária Brasilica*. 2010 (4): 294-927p.

56. Lilenbaum W. Atualizações em Leptospirose bovinas. Ver. Bras. Med. Vet. 1996 (13): 18p.
57. Oliveira SV, Arsky MLNS, Caldas EP. Reservatórios animais da leptospirose: Uma revisão bibliográfica. Saúde (Santa Maria). 2013 (39): 9-20p.
58. Lenharo DK, Santiago MEB, Lucheis SB. Avaliação sorológica para leptospirose em mamíferos silvestres procedentes do parque zoológico municipal de Bauru, SP. Arq. Inst. Biol. São Paulo 2012 (79) 333-341p.
59. Blazius RD, Romão PRT. Blazius EMCG. Silva OSS. Ocorrência de cães errantes soropositivos para *Leptospira* spp. Na Cidade de Itapema Santa Catarina, Brasil. Cad. Saúde Pública. Rio de Janeiro 2005 (6): 1952-1956p.
60. Lopes ALS, Silva WB. Padovani CR. Langoni H. Modolo JR. Frequencia sorológica antileptospírica em cães: sua correlação com roedores e fatores ambientais, em área territorial urbana. Arq. Inst. Biol. São Paulo 2005 (72): 289-296p.
61. Tesserolli GL, Alberti JVA. Bergamaschi C. Fayzano L. Agottani JVB. Principais sorovares de leptospirose caninca em Curitiba, Paraná. PUBVET. Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia. Londrina 2008 (2): 8p.
62. Fernandes ARF, Fernandes AG. Araújo VEJA. Higino SSS. Silva MLCR. Alves CJ. Azevedo SS. Soroepidemiologia da leptospirose caninca na região metropolitana de Natal, estado do Rio Grande do Norte. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. São Paulo. (50) 2013. 226-232p.
63. Azevedo SS, Fernandes ARF. Queiroga IMBN. Alves CJ. Moraes ZM. Santos CSAB. Vasconcellos AS. Ocorrência e fatores de risco associados à leptospirose em cães atendidos em hospital veterinário no

- semiárido paraibano. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. São Paulo. 2011 (48): 161-166p.
64. Castro JR, Salaberry SRS, Neto ABC, Ávila DF, Souza MA, Ribeiro AMCL. Leptospirose canina – Revisão de literatura. PUBVET. Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia. Londrina 2010 (4): 11p.
65. Sarmiento AMC, Azevedo SS, Moraes ZM, Souza GO, Oliveira FCS, Gonçalves AP, Miraglia F, Vasconcellos SA. Emprego de estirpes *Leptospira* spp. isoladas no Brasil na microtécnica de soroaglutinação microscópica aplicada ao diagnóstico da leptospirose em rebanhos bovinos de oito estados brasileiros. Pesq. Vet. Bras. 2012 (7): 601-606p.

APÊNDICE A**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Pesquisadores responsáveis: Amane Gonçales, Adriana Cortez, Celso Pinto, Rafael Agopian, Valéria Castilho Onofrio.

Telefone para contato: (11)21418562

Sua colaboração é importante e necessária para o desenvolvimento da pesquisa.

- A pesquisa analisa a ocorrência de doenças infecciosas em cães em campanhas de controle populacional animal na Zona Sul do município de São Paulo e será realizada através da coleta de sangue e urina do animal;
- Você poderá solicitar informações ou esclarecimentos sobre o andamento da pesquisa em qualquer momento com o pesquisador responsável, sendo o resultado do exame informado por e-mail ou telefone;
- Sendo um participante voluntário, você não terá nenhum pagamento e/ou despesa referente à sua participação no estudo;

Eu, _____ como voluntária da pesquisa, afirmo que fui devidamente informada respeito dos procedimentos a serem realizados para colheita de material biológico (sangue e urina) com o animal acima identificado, o qual sou responsável e proprietário de seu domicílio, e reconheço ainda a importância deste trabalho para o controle das doenças transmissíveis desta região, bem como para a saúde do animal sob meus cuidados. Meu nome não será divulgado de forma nenhuma e terei a opção de retirar meu consentimento a qualquer momento.

São Paulo, ____ de _____ de 201_

(Assinatura do representante legal (proprietário) do sujeito de pesquisa)

Assinatura do pesquisador

APÊNDICE B

DADOS DO ANIMAL E QUESTIONÁRIO

Nº _____ M____/ _____ Data: ____/____/____ RGA: _____

Nome do animal: _____ Raça: _____ Sexo: _____

Idade: _____ () Filhote () Adulto () Idoso

Nome do Proprietário: _____

Endereço: _____

Nº _____ Telefones: () _____

1. Vacinado contra leptospirose? Sim () Não ()

Faz mais de 6 meses? Sim () Não ()

2. Contato com áreas alagadas/água acumulada? Sim () Não ()

3. O cão tem acesso à rua? Sim () Não ()

4. Há presença de rios/lagos próximo a casa? Sim () Não ()

5. Há terreno baldio próximo a casa? Sim () Não ()

6. Tem região de mata próxima a casa? Sim () Não ()

7. Há esgoto a céu aberto próximo ou dentro do domicílio? Sim () Não ()

8. Há presença de ratos na casa ou próximo ao domicílio? Sim () Não ()

9. O cão tem hábito de caçar? Sim () Não ()

10. Quantos cães residem na casa?

(_____)

11. Contato com outros cães? Sim () Não ()

12. Os potes de ração e água são recolhidos à noite? Sim () Não ()

13. Contato com outros animais?

Quais? _____