

UNIVERSIDADE SANTO AMARO

Mestrado em Medicina e Bem-Estar Animal

Fernanda Aparecida da Silva Hernandez

**LEPTOSPIROSE CANINA NO MUNICÍPIO DE FRANCO DA ROCHA,
SP**

São Paulo

2020

Fernanda Aparecida da Silva Hernandez

**LEPTOSPIROSE CANINA NO MUNICÍPIO DE FRANCO DA ROCHA,
SP**

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

Orientador: Profª Drª Amane Paldês Gonçalves

São Paulo

2020

H478 Hernandez, Fernanda Aparecida da Silva
Leptospirose canina no município de Franco da Rocha, SP /
Fernanda Aparecida da Silva Hernandez. – São Paulo, 2020.

46 f.: il.

Mestrado (Medicina Veterinária e Bem-Estar Animal) –
Universidade Santo Amaro – 2020.

Orientador: Profa. Dra. Amane Paldês Gonçalves

1. Leptospirose canina. 2. Cães errantes. 3. Soroaglutinação
microscópica. 4. Isolamento I. Gonçalves, Amane Paldês, orient. II.
Universidade Santo Amaro III. Título

Programa de Pós-graduação Stricto Sensu
Medicina Veterinária - Mestrado
Ata de Dissertação

Ao **décimo sétimo dia do mês de dezembro do ano de dois mil e vinte**, via Webconferência, conforme Regimento Geral e Regulamento de Pós-graduação da UNISA teve início às 14h00min, o exame de Dissertação intitulada **“Leptospirose canina no município de Franco da Rocha, SP”**. Do(a) mestrando(a) **Fernanda Aparecida da Silva Hernandez**, regularmente matriculado(a) no programa de Mestrado em Medicina Veterinária. Os requisitos exigidos foram cumpridos conforme registros constantes nos arquivos da Secretaria de Pós-graduação segundo encaminhamento do Prof. Doutor Rafael Garabet Agopian, Coordenador do Programa. Os trabalhos foram instalados pelo presidente da banca examinadora e orientador Profa. Dra. Valéria Castilho Onofrio, Pós-doutorada pelo Instituto Butantan, que foi constituída pelos seguintes professores: Profa. Dra. Adriana Cortez, Doutorada em Ciências Biológicas pelo Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Profa. Dra. Gisele de Oliveira de Souza, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo FMVZ/USP. A banca examinadora, tendo decidido aceitar a pesquisa, passou à arguição do(a) aluno(a). Encerrados os trabalhos, deram o parecer final conforme consta a seguir:

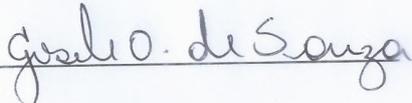
Profa. Doutora Valeria Castilho Onofrio

Parecer: Aprovada Assinatura: 

Profa. Doutora Adriana Cortez

Parecer: Aprovada Assinatura: 

Profa. Doutora Gisele de Oliveira de Souza

Parecer: Aprovada Assinatura: 



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER N.04/2019

Projeto de Pesquisa: "Prevalência da leptospirose canina no município de Franco da Rocha, SP"

Pesquisador Responsável: Profa. Amane Paldês Gonçalves
Fernanda Aparecida da Silva Hernandez

Curso: Medicina Veterinária

Prezado Pesquisador:

Ao se proceder à análise do processo em questão, coube a seguinte deliberação: O Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (**CEUA-UNISA**), seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo animais, conforme a Lei federal nº 11.794 (Lei Arouca), as resoluções do CONCEA, que estabelecem os procedimentos para o uso científico de animais no país e a Lei Estadual nº 11.977/05 que institui o Código de Proteção aos Animais do Estado de São Paulo, deliberando pela **Aprovação** do Projeto **"Prevalência da leptospirose canina no município de Franco da Rocha, SP"**.

São Paulo, 25 de abril de 2019.

PROFA. DRA. VALERIA CASTILHO ONOFRIO
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
UNISA - Universidade Santo Amaro

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão, Campus I, Rua Prof. Enéas de Siqueira Neto, 340– Jd. das Imbuías
CEP:04829-300, São Paulo – SP, Fone: (11) 2141-8687.
Email: ceua@unisa.br

“Dedico este trabalho ao meu pai Cevanil (in memoriam), minha inspiração, meu maior exemplo de dedicação e perseverança nos estudos e na vida, o ser humano mais íntegro e ético que eu já conheci, que sempre me incentivou e sempre esteve ao meu lado.”

Agradecimentos

É com imensa gratidão que agradeço primeiramente a Deus, por todas as oportunidades da vida, por iluminar o meu caminho e ter me dado forças para não desanimar e saúde para continuar lutando pelos meus objetivos.

Agradeço especialmente ao meu marido Rafael, pelo carinho, compreensão, apoio, incentivo, dedicação e paciência. Sem você teria sido impossível realizar este trabalho, você também faz parte desta história, você faz parte de cada vitória minha!

Agradeço aos meus filhos Isabella, Luiz Fernando e Luiz Antonio que são os maiores presentes que Deus poderia ter me dado nesta vida, pelo apoio e por saberem esperar a minha ausência.

Agradeço imensamente à Dra. Renata Silva, minha irmã, pela qual tenho muita estima e admiração, pela assistência, apoio e tempo dedicado.

Agradeço a minha mãe Sueli, cuja presença foi essencial em minha vida, que sempre me apoiou e me incentivou em meus sonhos e projetos.

Agradeço as minhas amigas de turma Daniela Reggiani e Fernanda Bruno, pelo companheirismo, amizade e carinho que tiveram comigo.

Agradeço aos professores do curso, pelos quais tenho respeito e admiração, por todo o aprendizado e carinho.

Agradeço a equipe do Laboratório de Zoonoses Bacterianas VPS da USP, em especial ao Dr. Marcos Brayan Heinemann e à Dra. Gisele Oliveira de Souza.

Agradeço com imensa gratidão a Dra. Amane, minha orientadora, que com maestria me orientou nesta jornada, sendo sempre carinhosa, amiga e prestativa. Agradeço pela confiança em mim depositada e por acreditar em meu potencial.

“O ser humano vivencia a si mesmo seus pensamentos como algo separado do resto do universo - numa espécie de ilusão de ótica de sua consciência. E essa ilusão é uma espécie de prisão que nos restringe a nossos desejos pessoais, conceitos e ao afeto por pessoas mais próximas. Nossa principal tarefa é a de nos livrarmos dessa prisão, ampliando o nosso círculo de compaixão, para que ele abranja todos os seres vivos e toda a natureza em sua beleza. Ninguém conseguirá alcançar completamente esse objetivo, mas lutar pela sua realização já é por si só parte de nossa liberação e o alicerce de nossa segurança interior”

Albert Einstein

RESUMO

A leptospirose é uma zoonose com distribuição mundial que afeta várias espécies, incluindo animais domésticos, silvestres e os seres humanos. Causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*. A doença é endêmica nos países tropicais, mas também ocorre em zonas subtropicais e temperadas e sua ocorrência é favorecida pelas condições geoclimáticas e sociais, que facilitam a transmissão e contribuem para crescente incidência da doença. A leptospirose tem sido reconhecida como um importante problema emergente de saúde pública global e os cães também podem desempenhar um papel importante na manutenção das leptospiras no ambiente urbano e na sua transmissão aos seres humanos devido ao contato próximo com estes. Os cães errantes e os cães de abrigo são considerados os mais suscetíveis à infecção por leptospiras devido a um maior grau de exposição ambiental ao agente/patógeno. Este projeto tem como objetivo realizar um estudo sobre a leptospirose canina no município de Franco da Rocha, SP por meio de um levantamento sorológico e do isolamento de leptospiras e para isso, foram coletadas 207 amostras de sangue e seis amostras de urina de cães errantes, comunitários e de abrigo do município. Foram sororreagentes 36 do total de 207 cães (17,39%) para pelo menos um sorovar testado, com títulos variando de 100 a 12800. Seis cães (16,66%) foram sororreativos com títulos ≥ 800 e 4 cães (11,11%) apresentaram reações cruzadas para até oito sorovares diferentes. O sorovar mais frequente foi o Canicola com 12 amostras (33,33%), seguidos do sorovar Butembo com 9 amostras (25,0%) e Australis com 3 amostras (8,33%), os sorovares Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Pomona e Sentot foram sororreagentes com duas amostras cada (5,55%) e os sorovares Castellonis, Hebdomadis e Hardjobovis apresentaram uma amostra reagente (2,17%). No entanto o título mais alto foi detectado contra o sorovar Butembo. Os cultivos bacterianos de leptospiras das amostras de urinas coletadas foram negativos. Os resultados sugerem que a população canina pode desempenhar um papel importante na infecção por leptospiras para diversas espécies nesta região.

Palavras-chave: Leptospirose canina. Cães errantes. Soroaglutinação microscópica. Isolamento.

ABSTRACT

Leptospirosis is a zoonosis with worldwide distribution that affects several species, including domestic animals, wild animals and humans. It is caused by pathogenic spirochetes of the genus *Leptospira*. The disease is endemic in tropical countries, but it also occurs in subtropical and temperate zones and its occurrence is favored by geoclimatic and social conditions, which facilitate transmission and contribute to the increasing incidence of the disease. Leptospirosis has been recognized as an important emerging global public health problem and dogs can also play an important role in maintaining leptospirae in the urban environment and in transmitting them to humans due to close contact with them. Stray dogs and shelter dogs are considered to be the most susceptible to leptospiral infection due to a greater degree of environmental exposure to the agent / pathogen. This project aims to conduct a study on canine leptospirosis in the municipality of Franco da Rocha, SP by means of a serological survey and isolation of leptospirae and for this purpose, 207 blood samples and six urine samples from community stray dogs were collected and shelter in the municipality. 36 out of 207 dogs (17.39%) were seroreactive for at least one tested serovar, with titers ranging from 100 to 12800. Six dogs (16.66%) were seroreactive with titers ≥ 800 and 4 dogs (11,11 %) presented cross reactions for up to eight different serovars. The most frequent serovar was Canicola with 12 samples (33.33%), followed by Butembo serovar with 9 samples (25.0%) and Australis with 3 samples (8.33%), Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Pomona and Sentot were seroreactive with two samples each (5.55%) and the serovars Castellonis, Hebdomadis and Hardjobovis presented a reagent sample (2.17%). However, the highest titer was detected against the Butembo serovar. The bacterial leptospiral cultures of the collected urine samples were negative. The results suggest that this canine population may play an important role in leptospiral infection for several species in this region.

Keywords: Canine leptospirosis. Stray dogs. Microscopic serum agglutination. Isolation.

Lista de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Mapa da hidrografia do município de Franco da Rocha, SP..... | 29 |
|---|----|

Lista de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Distribuição de sorogrupos, sorovares e títulos de anticorpos obtidos pelo Teste de Soroaglutinação Microscópica em cães errantes no município de Franco da Rocha – 2020..... | 34 |
| Tabela 2 – Distribuição do número de cães, amostras e soropositividade para leptospirose por bairro do município de Franco da Rocha, SP..... | 35 |

Lista de Abreviaturas

| | |
|--------|--|
| CEUA | Comissão de Ética no Uso de Animais |
| DNA | Ácido Desoxirribonucléico |
| EMJH | Ellinghausen McCullough Johnson Harris |
| FUNASA | Fundação Nacional de Saúde |
| GVE | Grupo de Vigilância Epidemiológica |
| IBGE | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas |
| LPS | Camada Externa de Lipopolissacarídeos |
| MAT | Técnica de Soroaglutinação Microscópica |
| OIE | Organização Mundial de Saúde Animal |
| OMP | Proteínas da Membrana Externa |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| PCR | Reação em Cadeia da Polimerase |
| SHPL | Síndrome Hemorrágica Pulmonar associada à Leptospirose |
| SNIRH | Sistema Nacional de Informação de Recursos Hídricos |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 Introdução | 12 |
| 2 Justificativa..... | 14 |
| 3 Revisão de Literatura | 14 |
| 3.1 Aspectos Gerais..... | 14 |
| 3.2 Distribuição Geográfica..... | 15 |
| 3.3 Epidemiologia..... | 17 |
| 3.4 Etiologia | 20 |
| 3.5 Patogenia e Manifestações Clínicas | 21 |
| 3.6 Diagnóstico | 23 |
| 3.7 Prevenção e Controle | 25 |
| 3.7.1 Vacinação | 26 |
| 3.7.2 Outras medidas preventivas..... | 27 |
| 4 Objetivo | 28 |
| 5 Materiais e Métodos | 28 |
| 5.1 Área de estudo..... | 28 |
| 5.2 População alvo..... | 31 |
| 5.3 Colheita das amostras biológicas..... | 31 |
| 5.4 Técnica de Soroaglutinação Microscópica (MAT) | 31 |
| 5.5 Isolamento de leptospiras | 32 |
| 6 Resultados | 33 |
| 7 Discussão..... | 36 |
| 8 Conclusão | 39 |
| REFERÊNCIAS..... | 40 |

1 Introdução

A leptospirose é reconhecida como um importante problema emergente de saúde pública global por causa dos surtos epidêmicos. Vários surtos de leptospirose foram relatados em vários lugares do mundo nos últimos anos e muitos deles foram relacionados com catástrofes naturais como ciclones e inundações. Epidemias urbanas estão sendo relatadas em todo o mundo e provavelmente se intensificarão à medida que a população de favelas do mundo aumentar (COSTA et al., 2015), ratificando a importância da leptospirose como um problema sócio-ecológico, que geralmente ocorre no contexto de desigualdade social (VIJAYACHARI et al., 2011).

Em áreas endêmicas, a leptospirose é uma das principais causas de várias síndromes clínicas, como icterícia, miocardite, pneumonias atípicas e insuficiência renal (VIJAYACHARI et al., 2011) e, já foi demonstrada ser a causa de 5 a 69% dos casos agudos de febre indiferenciada ou não-malária em diferentes partes do mundo, sendo assim essa doença é uma causa importante de doença febril aguda (COSTA et al., 2015). A maioria dos casos de pacientes com leptospirose não é identificado clinicamente em razão do teste diagnóstico adotado, ocasionando subestimação da morbidade e mortalidade por leptospirose o que contribui diretamente para a sua negligência. Portanto, a leptospirose pode representar uma carga muito maior do que a indicada pelas estimativas de morbidade de doença grave (COSTA et al., 2015).

Em grandes centros urbanos, embora os roedores sejam comumente apontados como os principais disseminadores de leptospiras, os cães também podem desempenhar um papel importante na manutenção das leptospiras no meio ambiente e na sua transmissão aos seres humanos devido ao contato próximo com estes, situação que constitui um problema de saúde pública (DE PAULA DREER et al., 2013; JOUGLARD; BROD, 2000; OLIVEIRA LAVINSKY et al., 2012). Nas últimas décadas, observa-se um aumento da população canina em países em desenvolvimento devido à urbanização e variante social da população humana. Associado com as relações emocionais do homem com o cão e posse irresponsável, esse aumento pode levar à disseminação de doenças, já que o cão pode ser responsável pela transmissão de várias zoonoses (BATISTA et al., 2004).

No Brasil, o principal problema decorrente da posse irresponsável dos animais é o abandono, pois não há abrigos suficientes para os animais indesejados. Por esse motivo, o abandono é uma das principais fontes de cães e gatos errantes nas ruas. Esses animais geralmente sofrem pela falta de necessidade básica como abrigo, comida e água, e também podem eventualmente se tornarem fontes de infecção de diversas doenças para os seres humanos. O abandono é considerado crime pela Lei Federal de Crimes Ambientais 9605, de 12/02/1998 e desde 2008, a eutanásia de animais saudáveis é proibida no Estado de São Paulo e os animais capturados só podem ser destinados à adoção (DIAS et al., 2015). Além de cães errantes que vagam pelas vias urbanas, também há cães domiciliados que têm acesso às ruas. CANATTO et al. (2012), mostraram que a proporção de cães domiciliados com acesso à rua no município de São Paulo é de 64,4%. Animais nesta situação são mais comuns na periferia das cidades, situação que favorece o contato com outros animais e pode levar à transmissão de doenças zoonóticas.

Entre cães errantes, as zoonoses são facilitadas pelo contato direto com outros animais, inclusive na caça aos roedores, pelo hábito de vasculhar lixo em busca de comida, beber água parada, cheirar a urina de outros animais, lambe os órgãos genitais, pelo ato sexual e também pelo convívio em ambiente contaminado com leptospiros patogênicas. O fato desses cães permanecerem livres nas ruas e percorrerem longas distâncias, permite a disseminação do agente no ambiente e favorece a transmissão para outros animais e seres humanos (DE PAULA DREER et al., 2013). Os cães vadios e os cães de abrigo são considerados os mais suscetíveis à infecção por leptospiros devido a um maior grau de exposição ambiental ao agente patógeno (MIOTTO et al., 2018a). A leptospirose é pouco estudada nesses animais e as condições de saúde dos mesmos e os riscos que representam para a população com relação à disseminação dessa doença são pouco relatadas (NUNES et al., 2009).

2 Justificativa

A interação próxima entre os seres humanos e animais domésticos e silvestres, associada à fatores sociais e geoclimáticos, favorecem a ocorrência de doenças zoonóticas como a leptospirose.

No ambiente urbano, entre os animais domésticos, o cão é a principal fonte de infecção para os seres humanos, pois vive em estreito contato com o homem e pode eliminar leptospiras viáveis através da urina mesmo assintomáticos. Devido ao seu contato próximo com humanos, os cães podem atuar tanto como elos epidemiológicos ou como sentinelas de leptospiras patogênicas no meio ambiente.

Desta forma, faz-se necessário o desenvolvimento de estudos, a fim de estabelecer a ocorrência da leptospirose canina no município de Franco da Rocha e assim levar ao desenvolvimento de estratégias de saúde pública e veterinária que busquem medidas de controle e prevenção da leptospirose.

3 Revisão de Literatura

3.1 Aspectos Gerais

A leptospirose é uma zoonose com distribuição mundial que afeta várias espécies, incluindo animais domésticos e silvestres e os seres humanos e é causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*. A doença é endêmica nos países tropicais, mas também ocorre em zonas subtropicais e temperadas e sua ocorrência é favorecida pelas condições geoclimáticas e sociais, que facilitam a transmissão e contribuem para crescente incidência da doença (ISLANDS, 2011; PINTO et al., 2017).

Leptospiras patogênicas podem infectar diversas espécies de animais. Os cães, assim como os humanos podem ser infectados pelo contato direto com a urina de hospedeiros infectados ou pelo contato indireto de água ou urina contaminadas no ambiente (LEE et al., 2014). Os roedores são os hospedeiros de manutenção mais importantes no ciclo da leptospirose, mas uma ampla gama de

mamíferos, incluindo cães domésticos, também pode atuar como hospedeiro de leptospirosas patogênicas (LEVETT, 2001). A leptospirose é comum em cães e podem eliminar a bactéria na urina sem apresentar sinais clínicos da doença, podendo assim, levar à exposição de seres humanos, o que torna um problema de saúde pública (SCHULLER et al., 2015). Em humanos e animais a doença é geralmente assintomática, mas em alguns casos pode evoluir para um quadro clínico grave. Os sintomas associados à infecção por *Leptospira* em cães e humanos geralmente estão associados a lesões renais, hepáticas e pulmonares (FORNAZARI et al., 2012). A leptospirose é também conhecida como doença de Weil, síndrome de Weil, febre dos pântanos, febre dos arrozais, febre outonal, doença dos porquinhos, tifo canino, entre outras (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

3.2 Distribuição Geográfica

No mundo, estima-se anualmente 1,03 milhão de casos e 58.900 mortes devido à leptospirose. Esta doença está entre as principais causas zoonóticas de morbidade e mortalidade, principalmente em regiões tropicais e mais pobres do mundo (COSTA et al., 2015). As estimativas de incidência global de leptospirose foram obtidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) onde a região das Américas lidera em maior número de casos, seguidos da Europa, Pacífico Ocidental, Sudeste da Ásia e África, respectivamente. As regiões Mediterrâneo Oriental, que foi descrita como zero incidência e África com baixa incidência, provavelmente sofrem com más condições de diagnóstico (OMS, 2011).

A leptospirose é uma das principais doenças negligenciadas na América Latina, tem seu curso silencioso nesta e em outras regiões devido à escassez de dados e está associada a populações que vivem em condições vulneráveis em ambientes urbanos e rurais como pobreza, falta de água, saneamento e más condições de habitação (PEREIRA et al., 2017; SCHNEIDER et al., 2015). O maior número de casos na América Latina foi observado no Brasil (40,2%), Peru (23,6%), Colômbia (8,8%) e Equador (7,2%). Uma taxa acumulada para a América Latina foi estimada em 2,0 por 100.000 habitantes. Em média, 65,1 % dos casos são do sexo masculino (SCHNEIDER et al., 2017).

Nas Américas e no Caribe, um estudo realizado entre 2010 e 2012, detectou uma correlação entre ocorrência de alertas de leptospirose com a ocorrência de inundações (SCHNEIDER et al., 2014). No Brasil, foi estimado que para cada aumento milimétrico da precipitação diária máxima no mês acima da média para o período, houve um aumento de 0,55% no número de casos de leptospirose em relação à média desse período (KUPEK et al., 2000). JORGE et al. (2017), analisaram a exposição da leptospirose humana e animal entre 2003 e 2007 na região Sul do Brasil e teve como resultado a correlação positiva da exposição canina à leptospirose com eventos de precipitação.

No Brasil, trata-se de uma doença endêmica. Os surtos epidêmicos ocorrem principalmente nas áreas metropolitanas durante os períodos de chuva e inundações, devido a fatores associadas à ambientes insalubres, más condições de saneamento e alta infestação de roedores portadores da bactéria que afetam sobretudo populações de baixa renda. Segundo KO et al. (1999), as mudanças no ambiente urbano, o crescimento acelerado e desordenado da população urbana e conseqüentemente a expansão das favelas urbanas, produzem condições que favorecem a transmissão da doença e criam novos ambientes para a disseminação da leptospirose em grandes centros urbanos. Nos últimos dez anos, foi registrado no país uma média de 3.600 casos por ano, onde as regiões Sul e Sudeste apresentaram o maior número de casos confirmados, seguidas pelo Nordeste. Nesse mesmo período, foi registrado uma média de 375 óbitos por ano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Em série histórica, no período de 2014 a 2019, o Estado de São Paulo apresentou 3.652 casos confirmados e 488 óbitos e o Grupo de Vigilância Epidemiológica (GVE - 9) que engloba os municípios de Caieiras, Cajamar, Franco da Rocha, Francisco Morato e Mairiporã registrou, no mesmo período, 46 casos confirmados de leptospirose e três óbitos (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2020). Em relação ao local provável de infecção, 65,6% dos casos adquiriram a doença na área urbana e quanto ao ambiente provável de infecção, 41,9% adquiriram a doença no domicílio. Dos casos confirmados, 43,4% declararam presença de sinais de roedores 30 dias antes do aparecimento dos sintomas, sendo este considerado como um fator de risco para a infecção. (SECRETARIA DE ESTADO DA SAUDE DO ESTADO DE SÃO PAULO,

2017).

3.3 Epidemiologia

Embora a leptospirose seja uma doença de distribuição mundial, ocorre principalmente em países tropicais e subtropicais, onde as condições ambientais e as práticas socioculturais são favoráveis à transmissão da doença (WHO, 2011). As condições climáticas influenciam fortemente na sua ocorrência, pois favorecem a persistência das leptospiras no ambiente já que essas bactérias necessitam de condições de calor e umidade para sobreviver. Deste modo, favorecem a exposição humana e canina às águas superficiais aumentando o risco de leptospirose (JORGE et al., 2017).

O ciclo de transmissão da doença da leptospirose depende de sua natureza zoonótica. As espiroquetas patogênicas colonizam persistentemente os túbulos renais de um hospedeiro mamífero e são excretados pela urina em ambientes de água doce onde hospedeiros acidentais, como humanos, contraem infecção (FAINE, 1994). As leptospiras podem ser transmitidas de forma direta entre os hospedeiros por contato direto com a urina de animais infectados, via venérea ou ingestão de tecidos infectados. A transmissão indireta, que é mais frequente, ocorre através da exposição de animais ou humanos ao ambiente contaminado pela urina de animais infectados (GOLDSTEIN, 2010). Geralmente, a água e o solo ambientais são considerados reservatórios importantes para a transmissão da leptospirose em humanos e animais (BARRAGAN et al., 2017). Esta epidemiologia complexa que envolve diversas interações entre os animais, incluindo seres humanos, e o ambiente onde vive torna a leptospirose um paradigma de Saúde Única.

Antes mesmo de ter seu agente etiológico identificado, a leptospirose já era conhecida como uma infecção transmitida pelo meio ambiente. Consequentemente diversos estudos têm se concentrado em relatar a importância do meio ambiente no ciclo epidemiológico da leptospirose. BENACER et al. (2013), investigaram a prevalência e a patogenicidade da *Leptospira* existente no meio ambiente urbano da Malásia e mostrou a taxa de positividade de 23% das amostras de água e solo coletadas considerando uma prevalência relativamente alta. Isso provavelmente está

relacionado com o descarte inadequado de lixo, o que torna uma fonte de alimentos para roedores, cães, gatos e pássaros, que são disseminadores da doença e também existe a possibilidade de que as águas dos lagos foram contaminadas pela urina de animais domésticos presentes nas proximidades. GANOZA et al. (2006), usaram um ensaio quantitativo de PCR em tempo real e identificaram a presença de *Leptospira* em amostras de água ambiental de áreas rurais e urbanas na Amazônia Peruana evidenciando de 1 a 17.147 leptospiros/mL. No Brasil, um estudo realizado em uma favela urbana, avaliou 335 amostras de esgoto e 250 amostras de água parada, onde o DNA de *Lepstospira* foi detectado em 36% e 34% respectivamente, com uma concentração média de 152 leptospiros/mL (CASANOVAS-MASSANA et al., 2018).

Além dos fatores de risco ambientais de significância geral para a leptospirose, outros fatores foram associados à infecção canina como raça, sexo, idade, reprodução, atividade e estilo de vida como contato com gado, roedores ou espécies selvagens. E também variáveis ambientais como temperatura, umidade relativa, aumento de chuvas, inundações e ciclones, localização urbana ou rural dos cães associadas com condições higiênicas que favorecem a proliferação de roedores e também medidas preventivas tomadas por instituições de saúde animal, veterinários e tutores. Os cães que vivem em áreas urbanas apresentaram maior chance de doença do que os caninos que vivem em áreas rurais (RICARDO et al., 2020).

A prevalência de leptospirose canina varia de acordo com a localização geográfica e sua ocorrência já foi descrita mundialmente. Um recente estudo de meta-análise sobre leptospirose canina estimou que a prevalência média mundial foi de 18,5%, sendo que os países de alta renda apresentaram taxas de soroprevalência significativamente menores do que a média dos estudos. Foram encontradas prevalências para leptospirose canina de 1,8% na Austrália, 7,3% na China, 17,1% nos EUA, 27,4% no Brasil, 29,4% na Itália, 36,9% no Irã e 71,1% na Índia (RICARDO et al., 2020).

PINTO et al. 2017, realizaram uma revisão sistemática sobre leptospirose em cães, suínos e equinos na América Latina. Dentre os 45 artigos incluídos no estudo, a soroprevalência da leptospirose em cães variou de 4,9 a 72,0% e a mediana foi de

20,1%. Em 16 artigos (35,5%) o sorogrupo predominante foi o Canicola. Os cães são hospedeiros de leptospiros patogênicas e são suscetíveis à infecção por uma ampla variedade de sorovares (SCHULLER et al., 2015).

No Brasil, em uma revisão dos trabalhos publicados entre 2003 e 2013, a soroprevalência encontrada foi de 7,15% a 48,2% e os sorovares Canicola e Copenhageni foram os mais frequentes isolados em cães doentes ou saudáveis (HAGIWARA et al., 2015). Os cães atuam como hospedeiro de manutenção do sorogrupo Canicola e podem disseminar esse sorovar no ambiente (PINTO et al., 2017). Apesar disso, o sorogrupo Icterohaemorrhagiae é um dos principais agentes causadores da leptospirose canina em São Paulo, Brasil (MIOTTO et al. 2018b).

No município de Botucatu, SP, 179 (17,9%) do total de 1.000 cães amostrados, durante uma campanha anual de vacinação anti-rábica, foram reagentes para *Leptospira* spp. (LOPES et al., 2005). Em um outro estudo realizado no município do Rio de Janeiro - RJ, a soroprevalência de leptospirose encontrada foi de 10,8%, sendo 40 amostras positivas em um total de 368 amostras de sangue testados em cães errantes do município (NUNES et al., 2009). Essas prevalências foram bem menores do que a encontrada em um trabalho realizado na Bahia, onde se detectou 85% de soropositividade para *Leptospira* spp. nos cães errantes de Salvador, concluindo que a ocorrência da leptospirose em cães errantes é alta (VIEGAS et al., 2001).

Um estudo feito em 282 cães saudáveis residentes na área urbana da cidade de Ilhéus na Bahia, teve como resultado a soroprevalência de 7,1% dos cães testados para leptospirose. O estudo indica a presença do agente no ambiente que pode ser uma fonte de infecção para os humanos, apesar da baixa prevalência encontrada (OLIVEIRA LAVINSKY et al., 2012).

MIOTTO et al. (2016), realizaram um estudo de um cão que foi mantido em abrigo público na cidade de São Paulo, Brasil. Ele apresentou excreção urinária de longo prazo de *Leptospira santarosai*, sorogrupo Sejroe, detectada por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). O cão não apresentava títulos anti-*Leptospira* ou anormalidades clínicas / laboratoriais. Este é o primeiro caso relatado na literatura do isolamento de *L. santarosai* em cães. Essa descoberta mostra que os cães podem persistentemente abrigar outras leptospiros além de *L. interrogans*.

Entre 2013 e 2016, foram coletadas amostras de sangue e urina em cães com sintomas suspeitos de leptospirose tratados no Serviço do Hospital Veterinário da Universidade de São Paulo (Hovet FMVZ-USP). Dos 33 cães incluídos no estudo, 18 (55,5%) foram sororreagentes e o sorogrupo Icterohaemorrhagiae foi o predominante. A leptospirose aguda foi diagnosticada em oito cães (24,2%) pelo Teste de Soroaglutinação Microscópica (MAT) com títulos ≥ 800 . O DNA (Ácido Desoxirribonucleico) leptospiral foi detectado em 14 de 33 animais. Os cães positivos para PCR foram identificados como *L. interrogans* sorogrupo Icterohaemorrhagiae (MIOTTO et al., 2018b). Em outro estudo realizado em cães errantes e abrigados na cidade de São Paulo, Brasil, foi detectado DNA leptospiral em 13 de 123 cães estudados, onde a análise filogenética revelou que 10 cães estavam infectados pela *L. interrogans* sorogrupo Canicola e três pela *L. santarosai* sorogrupo Serjoe (MIOTTO et al., 2018a).

De acordo com BATISTA et al. (2004), as diferenças nos percentuais entre os resultados encontrados em diversos inquéritos epidemiológicos, podem se dar por vários fatores que influenciam na ocorrência da leptospirose, como topografia, região, temperatura, umidade, precipitações pluviométricas, reservatórios selvagens, reservatórios domésticos e também pela diferença das populações caninas estudadas.

3.4 Etiologia

A leptospirose é causada por bactérias espiroquetas aeróbicas obrigatórias pertencentes a ordem Spirochaetales, família Leptospiraceae, gênero *Leptospira*. As espiroquetas são bactérias móveis, alongadas, finas, flexíveis e compostas por espirais finas com formato de gancho em uma ou ambas as extremidades, esta última característica é que a diferencia de outras espiroquetas. A mobilidade é conferida pelos movimentos de rotação e translação ao longo de seu próprio eixo. (GOLDSTEIN, 2010; SCHULLER et al., 2015). Multiplicam-se em pH 7,2 a 7,4 e em temperaturas de 10 a 34°C e são sensíveis à dessecação e ao pH ácido. No ambiente, podem sobreviver e permanecer viáveis por meses, principalmente nos solos úmidos e em temperatura ambiente. Mas apesar dessa sobrevivência por longos períodos, acredita-se que as cepas patogênicas não podem se multiplicar no

ambiente (BARRAGAN et al., 2017; BENACER et al., 2013; BIERQUE et al., 2020; DE PAULA DREER et al., 2013; GANOZA et al., 2006).

As leptospiras possuem uma membrana externa composta por lipopolissacarídeo (LPS) e lipoproteínas (proteínas da membrana externa - OMP). O LPS é altamente imunogênico e é responsável pela especificidade dos sorovares (LEVETT, 2001). Foram descritos aproximadamente 250 sorovares diferentes associados a 24 sorogrupos (SCHULLER et al., 2015). Cada sorogrupo é composto por vários sorovares, que estão intimamente relacionados, devido aos seus determinantes antigênicos na membrana externa. Esses antígenos da membrana externa são os responsáveis pela indução de aglutinantes em soro de indivíduos infectados e são a base do fenotípico *in vitro* na classificação das leptospiras (ANDRÉ-FONTAINE, 2006).

VINCENT et al. (2019), sugeriram uma reclassificação para o gênero *Leptospira*, através da biologia molecular por meio da análise de sequenciamento total, o gênero foi dividido em 64 espécies e classificados em dois grupos filogenéticos, divididos em quatro sub-grupos. São eles:

Clado S - Subclado S1: espécies saprófitas.

Subclado S2: *Leptospira idonii* sp., está sozinha nesse grupo, pois o sequenciamento total ainda não foi realizado.

Clado P - Subclado P1: espécies patogênicas.

Subclado P2: espécies ditas “intermediárias”. São bactérias isoladas no ambiente, porém a virulência ainda não foi determinada.

3.5 Patogenia e Manifestações Clínicas

A leptospirose é uma doença que acomete vários órgãos. Após a penetração na pele ou mucosas, as leptospiras patogênicas alcançam o espaço vascular, iniciando a fase leptospirêmica da doença, onde multiplicam-se e atingem os tecidos alvos como o fígado, rins, baço, sistema nervoso central, olhos e trato genital. A leptospirose continua até que o organismo do indivíduo infectado elabore uma

resposta imune eficaz, com produção de anticorpos que passam a eliminar as leptospiros circulantes da maioria dos tecidos. Contudo, as leptospiros podem persistir em locais de privilégio imunológico como câmara anterior do olho e túbulos renais. Após a colonização renal, as bactérias persistem e multiplicam-se no epitélio dos túbulos renais e podem ser excretadas na urina de forma intermitente por um longo período de tempo (GREENE et al., 2011).

No fígado pode ocorrer hepatite colestática e necrose hepática o que ocasiona icterícia (SCHULLER et al., 2015). Nos rins, os danos são nefrite intersticial aguda provocando insuficiência renal. Essa alteração é causada pela multiplicação dos organismos nos túbulos renais ocorrendo a liberação de citocinas e recrutamento de células inflamatórias, que causam danos nos túbulos renais como necrose celular e apoptose e em alguns casos, pode ainda ocorrer alteração glomerular estrutural e funcional. Devido a persistência nos túbulos renais, as leptospiros são eliminadas na urina de forma intermitente por até longos períodos, essa fase é conhecida como leptospiúria (DE PAULA DREER et al., 2013; GOLDSTEIN, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019; SCHULLER et al., 2015). Os cães podem eliminar a bactéria na urina intermitentemente por longos períodos, mesmo quando assintomáticos (GOLDSTEIN, 2010).

Os efeitos das toxinas das leptospiros patogênicas também podem ser observados no tecido pulmonar levando a alterações pulmonares graves com hemorragia primária devido a dano endotelial e vasculite. A principal manifestação decorrente dos danos causados neste órgão é a Síndrome Hemorrágica Pulmonar associada à Leptospirose (SHPL) que está associada à alta mortalidade e morbidade. A extensão dos danos nos órgãos internos devido à infecção por *Leptospira* spp. é variável e depende de fatores como virulência do agente, incluindo sorovar e estirpe, e susceptibilidade do hospedeiro (ANDRÉ-FONTAINE, 2006; GOLDSTEIN, 2010; SCHULLER et al., 2015).

As manifestações da leptospirose em cães variam de doenças subclínicas a doenças agudas e a infecção pode resultar em morte súbita, insuficiência renal aguda, doença hepática, vasculite, uveíte e hemorragia pulmonar grave, sendo que a insuficiência renal e hepática aguda são as manifestações clínicas mais frequentes relatadas em cães com leptospirose (GOLDSTEIN et al., 2010). Devido a

apresentação clínica ser variável e muitas vezes inespecífica a leptospirose é uma doença sub-diagnosticada (KO et al., 1999).

KNOPFLER et al. (2017), em seu estudo que incluiu 99 cães, relatou que os sinais clínicos mais comuns, em fase inicial da doença foram letargia (96%), anorexia (88%), vômito (85%), alterações pulmonares (57%), dor abdominal (39%), diarreia (38%), oligúria (27%) e taquipnéia (26%). Os achados laboratoriais incluíram anemia (63%), trombocitopenia (63%), leucocitose (57%), aumento da uréia plasmática (84%) e concentrações de creatinina (81%), aumento das atividades de enzimas hepáticas (80%), hiperbilirrubinemia (69%), hiperfosfatemia (67%), hiponatremia (64%), hipoalbuminemia (55%) e hipocaliemia (29%).

MIOTTO et al. (2018a), em estudo com cães assintomáticos, detectaram leptospirúria em 13 de 123 cães estudados, ou seja, os cães estavam excretando leptospiros pela urina. Em outro estudo, MIOTTO et al. (2016) relataram a eliminação de leptospiros pela urina por um período de seis meses de um cão assintomático que não apresentava títulos antileptospirais no MAT, anormalidades clínicas ou laboratoriais. Esses resultados corroboram que os cães cronicamente infectados podem continuar excretando leptospiros pela urina e contribuir para a disseminação no meio ambiente (GOLDSTEIN, 2010; MIOTTO et al., 2018a).

3.6 Diagnóstico

Como a leptospirose é uma importante zoonose, a confirmação de um quadro clínico suspeito em um paciente veterinário é importante para uma perspectiva de saúde pública. O diagnóstico da infecção por *Leptospira* spp. em cães pode ser feito de modo direto, onde observa-se o agente ou o DNA ou por métodos indiretos, onde observa-se a presença de anticorpos antileptospiros. Existem vários métodos diretos de diagnósticos, como a cultura biológica de sangue, urina ou tecido. O isolamento é uma prova definitiva de infecção, porém o cultivo de leptospiros é difícil, pode levar meses e não contribui para um diagnóstico precoce, entretanto somente com o isolamento é possível realizar caracterização sorológica e molecular da estirpe infectante. A microscopia de campo escuro para identificar leptospiros em amostras de urina apresenta baixa sensibilidade e especificidade e precisa ser realizada com

urina fresca. Dentre os métodos diretos, ainda pode ser utilizada a PCR (MIOTTO et al., 2018a, 2018b).

Entre os métodos indiretos, o teste sorológico padrão ouro para o diagnóstico da leptospirose recomendado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) é o MAT, que indica o provável sorogrupo infectante, corroborando para a detecção da provável fonte de infecção. Esse método é a ferramenta mais usada em estudos epidemiológicos (LATOSINSKI et al., 2018; LEVETT, 2001; OIE, 2018; SUEPAUL et al., 2011). Para tal, o painel de antígenos utilizados no MAT deve incluir estirpes locais, o que aumenta a sensibilidade técnica em comparação com estirpes de referência (OIE, 2018). Porém, uma vez que a infecção pode ser causada por um sorovar raro ou por estirpes não descritas previamente, o conjunto de sorovares utilizados não deve ser limitado apenas a estirpes locais (MURILLO et al., 2020). Se o sorovar causador da infecção não estiver presente no painel de antígenos, a aglutinação pode não ser observada, gerando um resultado falso negativo, ou pode provocar reação cruzada de baixo título contra outros sorovares (GORIS; HARTSKEERL, 2014).

O MAT baseia-se na capacidade do soro de indivíduos em aglutinar sorovares leptospirais vivos *in vitro*. A reatividade do MAT a um sorovar sugere a exposição a um sorovar pertencente ao sorogrupo correspondente. Os anticorpos são detectáveis no sangue aproximadamente cinco a sete dias após infecção (LEVETT, 2001). O ponto de corte ideal do MAT é controverso, pois as infecções crônicas e subclínicas em que as estirpes são adaptadas ao hospedeiro, podem ser acompanhadas de títulos baixos, ao passo que na doença aguda está frequentemente associada a títulos altos. Além disso, a verificação da endemicidade em uma região específica também pode ser considerada na determinação de um ponto de corte apropriado, sugerindo que os pontos de corte podem variar entre as espécies ou regiões estudadas (PINTO et al., 2017).

Apesar de ser amplamente utilizada, o MAT possui limitações como alto número de reações cruzadas que pode comprometer os resultados desta técnica em áreas altamente endêmicas. As reações cruzadas pela técnica MAT ocorrem pela presença de vários antígenos comuns em diferentes leptospiras (FLORES et al., 2017). Outra desvantagem do teste é que indivíduos na fase inicial da infecção

podem não ser reagentes, por ainda não apresentarem anticorpos detectáveis, gerando um resultado negativo. No caso de infecção recente, faz-se necessário reavaliações com intervalo entre sete a 14 dias para que ocorra a soroconversão. Segundo NILOOFA et al. (2015), o MAT não é um teste sorológico adequado para diagnóstico precoce, pois carece de sensibilidade para uso em diagnóstico de doença aguda. Sua alta especificidade torna uma ferramenta útil para o diagnóstico confirmatório, sendo uma ferramenta importante para fins epidemiológicos. Além disso, o MAT não consegue distinguir títulos de infecção dos títulos induzidos por vacina. A maioria dos cães vacinados, tornam-se negativos para anticorpos aglutinantes em até 15 semanas após a vacinação, porém em uma pequena porcentagem de cães, os títulos vacinais podem persistir por 12 meses (MARTIN et al., 2014; MIOTTO et al., 2018b; SCHULLER et al., 2015).

Existem alguns obstáculos que os laboratórios enfrentam para a realização do MAT, como dificuldades para preparar os meios de cultura, dificuldade de manter os antígenos vivos, as culturas podem ser misturadas e facilmente contaminadas por outras bactérias (GORIS; HARTSKEERL, 2014).

Atualmente, a associação das técnicas de MAT, para detecção de anticorpos, e PCR para detecção de DNA leptospiral são as ferramentas de diagnóstico mais indicadas (MUSSO; SCOLA, 2013; SCHULLER et al., 2015).

3.7 Prevenção e Controle

O controle da leptospirose canina em áreas urbanas é de grande importância para Saúde Pública, visto que os cães podem atuar como elos epidemiológicos entre fontes ambientais e o homem, pois são mais expostos a fontes ambientais de infecção do que os humanos (RICARDO et al., 2020).

As estratégias para prevenção e controle devem incluir a vacinação dos cães em áreas de risco, etapas de manejo ambiental (GOLDSTEIN, 2010) e controle de roedores (JITTIMANEE; WONGBUTDEE, 2019).

3.7.1 Vacinação

A utilização de vacinas antileptospiras constitui um dos mais importantes meios de controle da leptospirose animal. A vacinação protege o animal contra os sinais agudos, mas pode não prevenir a infecção renal, portanto o animal vacinado pode ser um portador renal de leptospiras e eliminá-las no ambiente (ANDRÉ-FONTAINE, 2006). Os sorovares utilizados nessas vacinas são os mesmos em todo o mundo, no entanto, a real eficácia dessas vacinas em animais que habitam países tropicais é incerta. As vacinas comercialmente disponíveis no Brasil, têm como referência antígenos isolados em outros países, principalmente em regiões de clima temperado (PINTO et al., 2017).

As bacterinas bivalentes protegem contra os sorogrupos Canicola e Icterohaemorrhagiae, que são os responsáveis pela maioria das infecções em cães. Existem ainda, as vacinas quadrivalentes, que além da proteção contra os sorogrupos Canicola e Icterohaemorrhagiae, incluem os sorogrupos Grippotyphosa e Pomona, sendo seu uso recomendado para aumentar o espectro de proteção (SCHULLER et al., 2015), porquanto as vacinas induzem imunidade específica aos sorogrupos presentes e imunidade parcial aos sorogrupos heterólogos (SCHULLER et al., 2015).

O grande número de sorovares e as espécies implicadas na etiologia da leptospirose representam o maior desafio para o desenvolvimento de vacinas (PEREIRA et al., 2017). Os antígenos proteicos da membrana externa são os responsáveis pela proteção heteróloga e homóloga e os antígenos do LPS pela proteção homóloga (GREENE et al., 2011). Estudos sorológicos, apontam que as bacterinas induzem imunidade de menos de seis meses após curso primário e de um ano a cada revacinação anual. De acordo com estudos de imunização realizados por fabricantes de vacinas a duração da resposta imune induzida é de aproximadamente doze meses (ADLER; KLAASEN, 2015). Recomenda-se então, a vacinação com duas aplicações de três a quatro semanas de intervalo entre elas e revacinação anual para todos os cães em risco (SCHULLER et al., 2015).

Efeitos adversos após a vacinação contra leptospirose foram observados, porém com pouca frequência e ocorrem especialmente em cães de raças pequenas (MOORE et al., 2005). Há mais relatos de reações vacinais em bacterinas

quadrivalentes em comparação com as bivalentes. A maioria dos sinais relatados são ligados a reações alérgicas (ROBBINS, 2017). Em estudo realizado com 400 cães, as reações adversas ocorreram dentro de três dias após a aplicação da vacina e as principais alterações observadas foram edema facial ou periorbital (31%), urticária (21%), prurido generalizado (15%) e êmese (10%) (MOORE et al., 2005).

3.7.2 Outras medidas preventivas

Por apresentarem risco zoonótico (BERGMANN et al., 2017), os cães portadores, assintomáticos ou não, devem ser tratados com antibióticos capazes de eliminar a condição de portador renal. Atualmente, a doxiciclina é o medicamento de eleição para evitar a leptospirúria (MIOTTO et al., 2018a; PINTO et al., 2017).

Outra forma de prevenção é o controle populacional de cães (MAGALHÃES et al., 2007). Com o aumento da população de cães nos municípios (IBGE, 2013) e conseqüentemente o abandono, há um aumento na população de cães errantes nas cidades onde representam um risco à saúde pública, facilitando a transmissão de doenças zoonóticas. Por esse motivo, faz-se necessário a adoção de medidas preventivas como campanhas de esterilização, adoção e posse responsável para a redução desse problema (DE PAULA DREER et al., 2013; GUILLOUX et al., 2018), prevenindo assim doenças como a leptospirose.

No Brasil, com o crescimento desordenado das cidades, os serviços de saneamento básico, fundamentais na prevenção de doenças, sofrem precariedade e causam problemas de saúde pública de grande importância (OLIVEIRA et al., 2015). Dentre os problemas relacionados ao saneamento básico nas cidades, as enchentes e inundações representam um risco potencial para a transmissão de leptospirose (RAGHAVAN et al., 2012). Além disso, a falta de saneamento básico associada à sinantropia dos roedores, promovem um desequilíbrio e aumento populacional destes animais favorecendo a transmissão de doenças ao homem e animais domésticos (FUNASA, 2002).

Cabe aos municípios a elaboração de um programa de controle de roedores eficaz e para isso é necessária uma ação conjunta dos municípios com as comunidades através da educação em saúde (FUNASA, 2002). Estudos ecológicos

que identifiquem as espécies de roedores predominantes em cada área e os fatores ambientais que facilitam a sua presença no ambiente como alimento, abrigo, predadores e competidores são de extrema importância para implantação de métodos de controle dos mesmos para a prevenção da leptospirose (CHANNON et al., 2000; SANTOS, 2009).

4 Objetivo

O objetivo deste projeto foi realizar um estudo sobre a leptospirose canina no município de Franco da Rocha, SP por meio de um levantamento sorológico e do isolamento de leptospirosas.

5 Materiais e Métodos

Os procedimentos foram autorizados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNISA, parecer nº 04/2019.

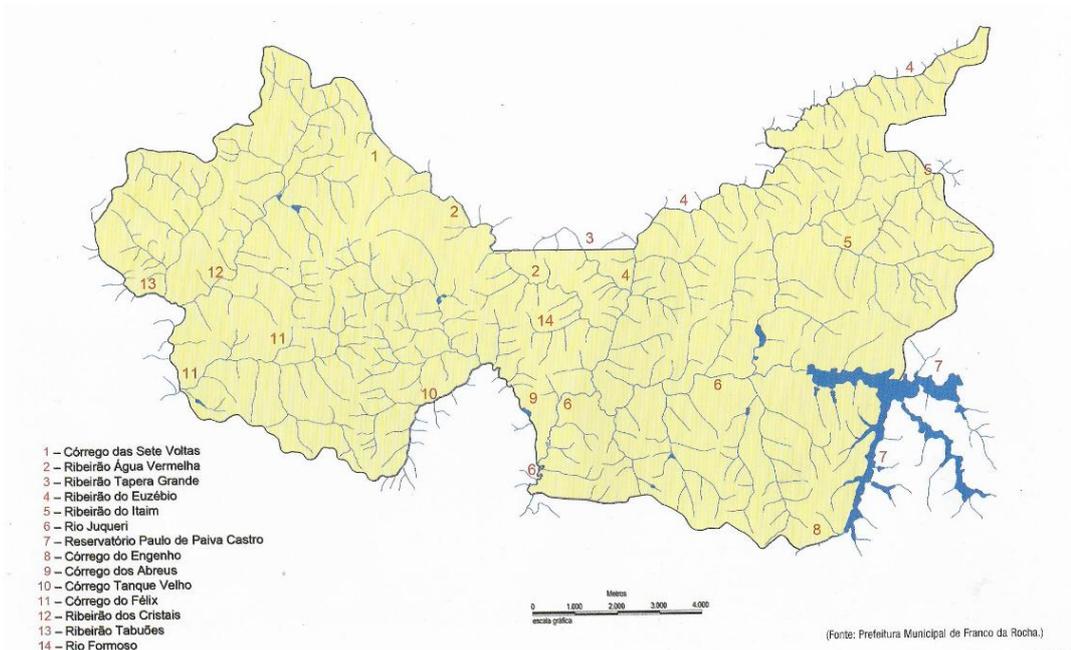
5.1 Área de estudo

Este estudo foi realizado no município de Franco da Rocha (23° 19' de latitude Sul e 46° 43' de longitude Oeste) localizado na região metropolitana de São Paulo e pertencente a sub-região norte da grande São Paulo, estado de São Paulo, Brasil. A cidade possui o clima quente e temperado e precipitação média anual de 1.369 mm. A população estimada em 2019 foi de 154.489 habitantes e a área é de 132,77km², o que resulta numa densidade demográfica de 980,95 hab/km², de acordo com o censo do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas (IBGE, 2019).

Faz parte do território do município o Rio Juquery, importante afluente do Rio Tietê, o Rio Formoso e 13 ribeirões e córregos (Figura 1), onde a qualidade da água na maior parte dos rios é péssima ou ruim, principalmente nos locais de maior densidade demográfica, com poucos trechos de qualidade aceitável (HOLTZ & VIEIRA, 2012). Entre os municípios de Franco da Rocha e Mairiporã está localizada a quarta represa do Sistema Cantareira denominada Engenheiro de Paiva Castro,

com uma área de aproximadamente 5,1 km² (CÔRTEZ et al., 2015). O conjunto de represas é responsável por abastecer cerca de 60% da população da região metropolitana de São Paulo, é uma das atrações turísticas do município de Franco da Rocha e já foi muito usado para esportes aquáticos e pesca (PREFEITURA MUNICIPAL DE FRANCO DA ROCHA, 2020).

Figura 1 – Mapa da hidrografia do município de Franco da Rocha, SP



(Fonte: HOLTZ & VIEIRA, 2012, p.23)

Por ser um local cortado por vários rios e córregos, o município sempre foi conhecido por sofrer com as enchentes, acometendo principalmente o centro da cidade. O Instituto Geológico (2006), realizou um mapeamento de áreas de risco a escorregamento e inundações do município de Franco da Rocha. Os estudos foram realizados em 31 áreas-alvo definidas, onde foram identificadas situações de risco com graus diferenciados quanto à probabilidade, tipologia dos processos geodinâmicos envolvidos e severidade dos potenciais eventos, resultando na delimitação de 136 setores. Do total de setores, 24 apresentaram risco a inundações/solapamento de margens, sendo cinco setores com grau de risco baixo, oito com grau de risco médio, nove com grau de risco alto e dois com grau de risco

muito alto. Um total de 5.229 moradias foram identificadas como sujeitas a algum tipo de risco nos setores mapeados, onde 594 moradias estão em áreas sujeitas a ocorrência de inundação (130 em grau de risco baixo, 141 em grau de risco médio, 218 em grau de risco alto e 105 em grau de risco muito alto). Vale ressaltar que após esse estudo realizado em 2006, a população de Franco da Rocha cresceu em 26,4%.

A cobertura vegetal do município é de 3.068,35 hectares, o que corresponde a 21,46% da área total do município (14.300 hectares). A maior parte da vegetação está concentrada no Parque Estadual do Juquery que é uma extensão da Serra da Cantareira. Trata-se de uma unidade de conservação ambiental localizado numa altitude de aproximadamente 900 metros (HOLTZ & VIEIRA, 2012). O município compreende área de manchas urbanas em fragmentação ambiental, apresentando muitos resquícios de mata, tendo a urbanização fragmentada. A mancha urbana se espalha seguindo o traçado das principais rodovias que convergem para São Paulo (DE MELLO-THÉRY, 2011).

O município de Franco da Rocha possui características de cidade dormitório, apresenta desigualdades sociais relevantes com mais de 25% da população de pobres, taxa de analfabetismo elevada e precárias condições sanitárias, onde 68,4% da população tem acesso à rede de coleta de esgoto e 0% de tratamento de esgoto e ainda somente 30% dos domicílios urbanos em vias públicas apresentam urbanização adequada (bueiro, calçada, pavimentação e meio-fio). A cidade ainda apresenta transição demográfica lenta e tardia (IBGE, 2019; SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2014; SNIRH, 2017). É classificado no Índice Paulista de Responsabilidade Social no grupo cinco, que são os municípios mais desfavorecidos, tanto nos indicadores econômicos como sociais (INSTITUTO GEOLÓGICO, 2006).

5.2 População alvo

Cães errantes, comunitários e de abrigo, pertencentes das zonas urbana e rural do município de Franco da Rocha/SP. Todos os cães eram assintomáticos, ou seja, os cães não apresentavam sintomatologia clínica para leptospirose presentes ao exame físico no momento da colheita das amostras.

5.3 Colheita das amostras biológicas

A colheita das amostras ocorreu no período de maio de 2019 a outubro de 2020.

As coletas de sangue foram feitas por punção da veia cefálica utilizando tubos a vácuo de 5mL com ativador de coágulo. As amostras foram centrifugadas para a obtenção do soro, aliquotadas e destinadas à investigação de anticorpos anti-leptospiras por meio da técnica de Soroaglutinação Microscópica (MAT).

As amostras de urina foram coletadas por sonda uretral descartável em cães machos e foram destinadas ao cultivo bacteriano e ao isolamento das leptospiras e foram semeadas em meios específicos imediatamente após as coletas.

5.4 Técnica de Soroaglutinação Microscópica (MAT)

O MAT foi realizado no Laboratório de Zoonoses Bacterianas – VPS (USP), utilizando um painel de antígenos vivos, com 24 sorovares representando 20 sorogrupos: *L. interrogans* sorogrupos Australis (sorovares: Australis, Bratislava); Autumnalis (sorovar: Autumnalis); Bataviae (sorovar: Bataviae); Canicola (sorovar: Canicola); Hebdomadis (sorovar: Hebdomadis); Icterohaemorrhagiae (sorovares: Copenhageni, Icterohaemorrhagiae); Pomona (sorovar: Pomona); Pyrogenes (sorovar: Pyrogenes); Sejroe (sorovares: Hardjo, Wolffi); Djasiman (sorovar: Sentot); *L. borgpetersenii* sorogrupos Ballum (sorovar: Castellonis); Javanica (sorovar: Javanica); Tarassovi (sorovar: Tarassovi); Celledoni (sorovar: Whitcombi); *L. kirschneri* sorogrupos Autumnalis (sorovar: Butembo); Grippotyphosa (sorovar: Grippotyphosa); Cynopteri (sorovar: Cynopteri); *L. noguchi* sorogrupo Panama

(sorovar: Panama); *L. santarosai* sorogrupo Shermani (sorovar: Shermani); *L. biflexa* sorogrupos Andamana (sorovar: Andamana); Seramanga (sorovar: Patoc). O ponto de corte para uma reação MAT positivo foi definido como título maior ou igual a 100. O sorovar mais provável foi definido como o sorogrupo com o título máximo direcionado contra um único sorovar e as aglutinações restantes foram consideradas reações cruzadas.

Os soros a serem testados foram diluídos na proporção 1:50 em solução salina tamponada de Sorensen. Cinquenta microlitros de cada diluição foram adicionadas em microplacas de poliestireno e 50 μ L de antígeno foi adicionado a cada diluição de soro, perfazendo um volume final de 0,1 mL. As microplacas foram incubadas a 28°C por três horas. As reações foram visualizadas em microscópio de campo escuro e os graus de aglutinação foram registrados como sendo: 0%, 25%, 50%, 75% ou 100% de aglutinação de leptospiras. Os títulos foram determinados até que o último poço mostrasse 50% ou mais de aglutinação (GALTON et al., 1965).

5.5 Isolamento de leptospiras

Após as coletas de urina que foram destinadas ao cultivo bacteriano, 500 μ L de urina foram diluídos em solução salina de Sorensen estéril nas concentrações 1:10 e 1:100 e posteriormente semeadas em meios de cultura Fletcher e Ellinghausen McCullough Johnson Harris (EMJH). Esse procedimento foi realizado em um raio de 20 cm da chama de vela. Os tubos com os meios de cultura (urina) foram incubados em estufa a 28°C e o crescimento bacteriano foi observado por cerca de seis semanas para verificação de anel de crescimento superficial (zona de Dinger) de leptospiras no meio. Após este período todas as culturas foram examinadas em microscópio de campo escuro para a verificação da presença de *Leptospira*.

6 Resultados

Durante o período estudado, foram colhidas amostras de sangue de 207 cães. Destes, 103/207 (49,75%) eram machos e 104/207 (50,24%) fêmeas, com diferentes idades, variando desde filhotes até cães idosos. A população canina consistia predominantemente de cães sem raça definida.

Foram sororreagentes, 36 do total de 207 cães (17,39%) para pelo menos um sorovar testado, com títulos variando de 100 a 12800. Seis cães (16,66%) foram sororreativos com títulos ≥ 800 e 4 cães (11,11%) apresentaram reações cruzadas para até oito sorovares diferentes. O sorovar mais frequente foi o Canicola com 12 amostras (33,33%), seguidos do sorovar Butembo com 9 amostras (25,0%) e Australis com 3 amostras (8,33%), os sorovares Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Sentot e Pomona foram sororreagentes com duas amostras cada (5,55%) e os sorovares Castellonis, Hebdomadis, e Hardjobovis apresentaram uma amostra reagente (2,17%). No entanto o título mais alto foi detectado contra o sorovar Butembo (12.800).

Não foi possível estabelecer o sorovar mais provável em um cão que apresentou reação cruzada para os sorovares Icterohaemorrhagiae e Copenhageni sob a mesma titulação (3.200), conforme demonstrado na Tabela 1.

Com relação a proveniência dos animais estudados, o Centro de Franco da Rocha foi o local que apresentou maior representatividade de amostras e maior soropositividade, sendo 83 (40%) e 17 (47,22%), respectivamente, conforme demonstrado na Tabela 2.

Tabela 1 – Distribuição de sorogrupos, sorovares e títulos de anticorpos obtidos pelo teste de Soroaglutinação Miscoscópica em cães errantes no município de Franco da Rocha – 2020.

| Sorogrupo | Sorovar | Título | | | | | | | Total (%) |
|---------------------|--------------------------------------|-----------|----------|-----------|----------|----------|----------|----------|-----------------|
| | | 100 | 200 | 400 | 800 | 1600 | 3200 | 12800 | |
| Canicola | Canicola | 9 | 1 | 2 | - | - | - | - | 12 (33,33) |
| Autumnalis | Butembo | - | 1 | 5 | 2 | - | - | 1 | 9 (25,0) |
| Australis | Australis | 2 | - | - | 1 | - | - | - | 3 (8,33) |
| Sejroe | Harjoprajitno | 1 | 1 | - | - | - | - | - | 2 (5,55) |
| Icterohaemorrhagiae | Icterohaemorrhagiae | - | - | 2 | - | - | - | - | 2 (5,55) |
| Pomona | Pomona | - | 1 | - | - | 1 | - | - | 2 (5,55) |
| Djasmani | Sentot | 2 | - | - | - | - | - | - | 2 (5,55) |
| Ballum | Castellonis | - | - | 1 | - | - | - | - | 1 (2,17) |
| Hebdomadis | Hebdomadis | - | 1 | - | - | - | - | - | 1 (2,17) |
| Sejroe | Harjobovis | 1 | - | - | - | - | - | - | 1 (2,17) |
| Icterohaemorrhagiae | *Copenhageni/ Icterohaemorrhagiae | - | - | - | - | - | 1 | - | 1(2,17) |
| Total | | 15 | 5 | 10 | 3 | 1 | 1 | 1 | 36 (100) |

* coaglutinação para múltiplos sorovares

Tabela 2 – Distribuição do número de cães, amostras e soropositividade para leptospirose por bairro do município de Franco da Rocha, SP.

| Bairro | Nº de cães (%) | Nº de Sororeagentes(%) |
|-------------------------------|----------------|------------------------|
| Centro ^a | 83 (40) | 17 (47, 22) |
| Jardim dos Lagos ^b | 22 (10,62) | - (-) |
| Parque Vitória ^a | 18 (8,69) | 2 (5,55) |
| Vila Ramos ^a | 15 (7,24) | 3 (8,33) |
| Mato Dentro ^b | 9 (4,34) | 1 (2,77) |
| Baltazar Fidélis ^a | 8 (3,86) | 2 (5,55) |
| Jardim Luciana ^b | 8 (3,86) | - (-) |
| Lago Azul ^a | 8 (3,86) | 1 (2,77) |
| Pouso Alegre ^a | 8 (3,86) | 2 (5,55) |
| Cedro do Líbano ^a | 4 (1,93) | 1 (2,77) |
| Jardim Alice ^a | 4 (1,93) | - (-) |
| Monte Verde ^a | 4 (1,93) | 1 (2,77) |
| Parque Munhoz ^a | 4 (1,93) | 1 (2,77) |
| Lanfranchi ^a | 4 (1,93) | 2 (5,55) |
| Parque Paulista ^a | 3 (1,44) | 1 (2,77) |
| São Benedito ^a | 3 (1,44) | - (-) |
| Vila Zanella ^a | 2 (0,96) | 2 (5,55) |
| Total | 207 (100) | 36 (100) |

^a Área Urbana

^b Área Rural

Todas as amostras de urina semeadas nos dois meios de cultura foram negativas para a presença de células com morfologia e motilidade características de leptospiros.

7 Discussão

Os resultados obtidos neste estudo fornecem dados referentes a perfil sorológico da leptospirose canina no município de Franco da Rocha, SP. A frequência encontrada foi de 17,39% semelhante a soroprevalência mundial estimada em 18,5% (RICARDO et al., 2020). Estudos realizados em populações caninas no Brasil, relatam soroprevalências variando de 6,8% no Rio Grande do Norte (FERNANDES et al., 2013) a 85% na Bahia (VIEGAS 2001).

O sorovar Canicola foi o mais frequente neste estudo (33,33%), resultado este que já era esperado, pois os cães são os hospedeiros de manutenção deste sorovar e podem disseminá-lo no ambiente quando infectados, mesmo assintomáticos, através da urina de forma intermitente (PINTO et al., 2017) representando assim, um risco zoonótico aos seres humanos. Os hospedeiros de manutenção quando infectados com o sorovar adaptado, tendem a apresentar eliminação da bactéria por um período mais longo do que quando comparados aos hospedeiros acidentais, que apresentam leptospirúria por um período mais curto (RICARDO et al., 2020).

Nos países desenvolvidos, o sorovar Canicola vem diminuindo nos inquéritos sorológicos pelo aumento de vacinação (RICARDO et al., 2020), já nos países menos desenvolvidos, como a América Latina e o Brasil, esse sorovar ainda é relatado como o mais frequente (PINTO et al., 2017; HAGIWARA et al., 2015). Nestas regiões as condições ambientais e socioeconômicas, fornecem um cenário ideal para a persistência e transmissão de leptospiros patogênicas (RICARDO et al., 2020).

O sorovar Butembo foi o segundo mais frequente e o que apresentou maior título no geral. O sorovar Butembo é mantido em reservatórios silvestres (SANTAROSA et al., 1980), entretanto, sua ocorrência já foi relatado em suínos, equinos (CALDART et al., 2015), caninos e seres humanos (JORGE et al., 2017).

Com base nos resultados sorológico deste estudo, foi possível observar que os cães são suscetíveis à infecção por uma ampla gama de sorovares, embora mundialmente, as infecções sejam mais comumente associadas à presença de anticorpos contra os sorogrupos Canicola e Icterohaemorrhagiae (SCHULLER et al., 2015). Os roedores são os hospedeiros de manutenção do sorovar

Icterohaemorrhagiae (BRASIL et al., 2018) e este sorovar já foi descrito no Brasil como sendo os mais frequentes em humanos (BLANCO et al., 2018; BLANCO; ROMERO, 2015) e em cães (MARTINS; LILENBAUM, 2013a; MIOTTO et al., 2018b). Os principais sorogrupos para os quais os cães da Europa soroconvertem são Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa, Australis, Sejroe e Canicola. Os diferentes sorovares predominantes em determinadas regiões, podem ser explicados pela distribuição de hospedeiros de manutenção relevantes em cada área (SCHULLER et al., 2015).

Os resultados desta pesquisa ainda demonstraram a ocorrência de reações sorológicas para outros sorovares considerados acidentais para cães (Australis, Castellonis, Haradojobovis, Hardjoprajitno, Hebdomadis, Pomona e Sentot), onde esses diferentes sorovares são considerados adaptados a hospedeiros de manutenção silvestres ou de produção que podem atuar como portadores de leptospiras patogênicas (OLIVEIRA et al., 2013; SCHULLER et al., 2015). É importante ressaltar que a maioria dos bairros de Franco da Rocha, incluindo o centro, possui características de áreas peri-urbanas, onde as atividades rurais e urbanas se misturam, permitindo o contato dos cães com animais silvestres e de produção, favorecendo assim, a transmissão de leptospiras patogênicas entre eles.

Nesta pesquisa, foram observados quatro casos de reações cruzadas para até oito sorovares diferentes. A reatividade dos anticorpos antileptospirais para múltiplos sorogrupos ou sorovares, pode impedir na determinação do sorogrupo infectante (SCHULLER et al., 2015), como no caso de um cão observado neste estudo, onde houve coaglutinação para múltiplos sorovares e não foi possível estabelecer o sorovar infectante, pois apresentaram o mesmo título (3200) para os sorovares Icteroaemorrhagiae e Copenhageni. As reações cruzadas entre sorovares de um mesmo sorogrupo ou de sorogrupos diferentes são mais comumente observadas na fase aguda da doença (WHO, 1967), principalmente durante as seis primeiras semanas (MILLER et al., 2011).

Foram observados seis cães com títulos variando de 800 a 12800. Esses títulos sugerem infecção aguda, já que em países endêmicos, mesmo quando assintomáticos títulos ≥ 800 podem ser considerados infecção em estágio inicial, usando uma única amostra de MAT (MARTINS; LILENBAUM, 2013b). Os

soropositivos que apresentaram títulos < 800 são indicativos de infecção crônica, pois geralmente são associados a títulos baixos, enquanto as infecções agudas são geralmente associadas a títulos elevados (MARTINS; LILENBAUM, 2013b).

Como a maioria dos cães deste estudo são errantes e não sabemos se foram vacinados ou não, e também não há possibilidade de fazermos testes pareados, não podemos descartar a possibilidade da reação na prova MAT ser devido a vacinação prévia. Cães não infectados e vacinados com vacinas antileptospiras de células inteiras bivalentes ou quadrivalentes podem ter títulos pós-vacinais de 6400 ou superiores para sorovares presentes na vacina. Embora a maioria dos cães vacinados tenham mostrado tornar-se negativos para anticorpos na semana 15 após a vacinação, os títulos vacinais podem persistir por 12 meses em uma pequena porcentagem de cães (SCHULLER et al., 2015). Além disso, a imunidade é restrita aos sorovares presentes na vacina (GRASSMANN et al., 2017).

Dos cães positivos no MAT, em relação ao sexo, 19 (52,77%) eram fêmeas e 17 (47,22%) eram machos e em relação a faixa etária, 22 (61,11%) eram cães adultos e 7 (19,44%) eram jovens e idosos. As variáveis ser macho, adulto e ter acesso à rua foram descritas como fatores de risco para a leptospirose em cães (RICARDO et al., 2020).

As amostras de urina semeadas em meios de culturas específicos destinadas ao isolamento da bactéria foram negativas. É importante ressaltar que há uma dificuldade intrínseca da técnica, pois o isolamento das leptospiras é particularmente desafiador. As leptospiras requerem meios de crescimento específicos e além disso têm crescimento lento, o que faz com que outras bactérias cresçam antes delas e acabe contaminando as amostras (MILLER et al., 2011).

O município de Franco da Rocha é cortado por vários rios e córregos com má qualidade da água, sofre com enchentes constantes, tem grande parte da população de pobres e precárias condições sanitárias. Além disso, há um número considerável de cães errantes que permanecem livres nas ruas. Essas condições ambientais e sociais favorecem a disseminação de doenças como a leptospirose, aumentando o risco de transmissão a seres humanos e animais (RICARDO et al., 2020). O centro de Franco da Rocha é o local do município que mais sofre com as enchentes e é onde foi encontrado o maior número de cães errantes circulantes e a maior

frequência de sororreativos. Um recente estudo de meta-análise mostrou que as probabilidades de infecção foram 68% maiores em cães que tiveram contato com fontes de água ambientais (RICARDO et al., 2020). De fato, três cães com títulos ≥ 800 , indicativos de infecção aguda, localizavam-se no Centro de Franco da Rocha às margens do Rio Juquery, onde é depositado grande parte do esgoto da cidade.

O município de Franco da Rocha pertence à região metropolitana de São Paulo e se encontra em grande área de fragmentação ambiental (DE MELLO-THÉRY, 2011). O resultado deste processo é a criação de habitats desfavoráveis, ou negativos, para um grande número de espécies, pois muda os mesohabitats e microhabitats disponíveis e todas as comunidades são afetadas. Dessa forma, pode ocorrer uma menor área de habitat de boa qualidade e eventuais populações excedentes destas áreas acabam migrando para outras áreas e passam a competir com as populações residentes (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2003). Além disso, a alta taxa de crescimento demográfico e migrações geram conflitos ambientais e invasões e expõe seus habitantes a riscos de inundações e deslizamentos (DE MELLO-THÉRY, 2011). Este ambiente diverso favorece as interações entre humanos e animais e podem levar à transmissão interespecie de sorovares distintos (BHARTI et al., 2003), o que explicaria a grande diversidade de sorovares/sorogrupos encontrados na população canina estudada que tem livre circulação entre estes diferentes ambientes.

8 Conclusão

As evidências sorológicas encontradas neste estudo indicam que os cães errantes, comunitários e de abrigo do município de Franco da Rocha, SP, estão expostos a vários sorovares de *Leptospira* spp. com predominância do sorovar Canicola, historicamente mantido por cães. Estes resultados sugerem que esta população canina pode desempenhar um papel importante na infecção por leptospiros para diversas espécies nesta região.

REFERÊNCIAS

- ADLER, B.; KLAASEN, E. Recent advances in canine leptospirosis: focus on vaccine development. **Veterinary Medicine: Research and Reports**, p. 245, 2015.
- ANDRÉ-FONTAINE, G. Canine leptospirosis-Do we have a problem? **Veterinary Microbiology**, v. 117, n. 1, p. 19–24, 2006.
- BARRAGAN, V. et al. Meta-analysis to estimate the load of *Leptospira* excreted in urine: Beyond rats as important sources of transmission in low-income rural communities. **BMC Research Notes**, v. 10, n. 1, p. 1–7, 2017.
- BATISTA, C. DE S. A. et al. Soroprevalência de leptospirose em cães errantes da cidade de Patos, Estado da Paraíba, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 2, p. 131–136, 2004.
- BENACER, D. et al. Pathogenic and saprophytic *Leptospira* species in water and soils from selected urban sites in peninsular Malaysia. **Microbes and Environments**, v. 28, n. 1, p. 135–140, 2013.
- BERGMANN ET AL. Diagnose der Leptospirose beim Hund. **Tierärztliche Praxis Ausgabe K: Kleintiere - Heimtiere**, v. 45, n. 3, p. 170–177, 2017.
- BHARTI AR, NALLY JE, RICARDI JN, MATTHIAS MA, DIAZ MM, LOVETT MA, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet**, v.3, p.757-71, 2003.
- BIERQUE, E. et al. A systematic review of *Leptospira* in water and soil environments. **PLoS ONE**, v. 15, n. 1, p. 1–22, 2020.
- BLANCO ET AL. Is the microagglutination test (MAT) good for predicting the infecting serogroup for leptospirosis in Brazil? **Physiology & behavior**, v. 176, n. 1, p. 1570–1573, 2018.
- BLANCO, R. M.; ROMERO, E. C. Fifteen years of human leptospirosis in São Paulo, Brazil. **Journal of Epidemiological Research**, v. 2, n. 1, p. 56, 2015.
- BRASIL, A. W. DE L. et al. Prevalence and risk factors to leptospira sp. Infection in dogs attended at veterinary clinics in João Pessoa, Paraíba State, Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 55, n. 3, p. 1–9, 2018.
- CALDART, E. T. et al. Zoonosis in dogs and cats attended by the Birth Control Project: *Toxoplasma gondii*, *Leishmania* spp. and *Leptospira* spp., serodiagnosis and epidemiology. **Semina:Ciencias Agrarias**, v. 36, n. 1, p. 253–266, 2015.
- CANATTO B.D. et al. Caracterização demográfica das populações de cães e gatos supervisionados do município de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, n.6, p.1515-1523, 2012.
- CASANOVAS-MASSANA, A. et al. Spatial and temporal dynamics of pathogenic *Leptospira* in surface waters from the urban slum environment. **Water Research**, v. 130, p. 176–184, 2018.
- CHANNON ET AL. A long-term study of *Rattus norvegicus* in the London Borough of

Enfield using baiting returns as an indicator of sewer population levels. **Epidemiology and Infection**, v. 125, n. 2, p. 441–445, 2000.

CÔRTEZ, P.L. et al. Crise de abastecimento de água em São Paulo e falta de planejamento estratégico. *Estudos avançados*. v. 29, n. 84, 2015.

COSTA, F. et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. 0–1, 2015.

DE MELLO-THÉRY, N. A. Conservação de áreas naturais em São Paulo. **Estudos Avancados**, v. 25, n. 71, p. 175–188, 2011.

DE PAULA DREER, M. et al. Toxoplasmosis, leptospirosis and brucellosis in stray dogs housed at the shelter in Umuarama municipality, Paraná, Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 19, n. 1, p. 23, 2013.

DIAS R.A. et al. Dog and cat management through sterilization: Implications for population dynamics and veterinary public policies. **Preventive Veterinary Medicine**, v.122, p. 154-163, 2015.

FAINE S. **Leptospira and Leptospirosis**. Boca Raton, FL: CRC Press; 1994.

FERNANDES, A. R. DA F. et al. Soroepidemiologia da leptospirose canina na região metropolitana de Natal, estado do Rio Grande do Norte. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 50, n. 3, p. 226, 2013.

FLORES, B. J. et al. A cross-sectional epidemiological study of domestic animals related to human leptospirosis cases in Nicaragua. **Acta Tropica**, v. 170, p. 79–84, 2017.

FORNAZARI, F. et al. Comparison of conventional PCR, quantitative PCR, bacteriological culture and the Warthin Starry technique to detect *Leptospira* spp. in kidney and liver samples from naturally infected sheep from Brazil. **Journal of Microbiological Methods**, v. 90, n. 3, p. 321–326, 2012.

FUNASA - Fundação Nacional de Saúde. Manual de controle de roedores. **Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde**, Brasília, 132 p. 2002.

GALTON, M. M. et al. Application of a Microtechnique To the Agglutination Test for Leptospiral Antibodies. **Applied microbiology**, v. 13, n. 1, p. 81–85, 1965.

GANOZA et al. Determining risk for severe leptospirosis by molecular analysis of environmental surface waters for pathogenic *Leptospira*. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 8, p. 1329–1340, 2006.

GOLDSTEIN, R. E. Canine Leptospirosis. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 40, n. 6, p. 1091–1101, 2010.

GORIS, M. G. A.; HARTSKEERL, R. A. Leptospirosis serodiagnosis by the microscopic agglutination test. **Current Protocols in Microbiology**, n. SUPPL.32, p. 1–18, 2014.

GRASSMANN, A. A.; SOUZA, J. D.; MCBRIDE, A. J. A. A universal vaccine against leptospirosis: Are we going in the right direction? **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. MAR, p. 1–8, 2017.

GREENE, C. E. et al. Leptospirose. In: **Doenças Infecciosas em Cães e Gatos**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanarabara Koogan, 2011.

GUILLOUX ET AL. Stray dogs in urban fragments: relation between population's perception of their presence and socio-demographic factors. v. 38, n. 1, p. 89–93, 2018.

HAGIWARA, M.K.; MIOTTO, B.A.; TOZZI, B.F. Revisão sobre leptospirose canina no Brasil. **Revista Clínica Veterinária**, v. 119, p. 86-104, 2015.

HOLTZ, J.L.A; VIEIRA, A.G.S. Atlas escolas histórico e geográfico: Franco da Rocha. São Paulo: Noovha América, 2012.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICAS. **Pesquisa nacional de saúde 2013. Acesso e utilização dos serviços de saúde, acidentes e violências : Brasil, grandes regiões e unidades da federação**, v. 39, n. 12, 100 p., 2013.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICAS. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/busca.html?searchword=franco+da+rocha>. Acesso em 28 de outubro de 2019.

INSTITUTO GEOLÓGICO. **Mapeamento de áreas de risco a escorregamento e inundações. Relatório Município de Franco da Rocha**. Termo de Cooperação Técnica IG-CEDEC, v. 1, 339 p., 2006.

ISLANDS, N. Leptospirosis: an emerging public health problem. **Relevé épidémiologique hebdomadaire / Section d'hygiène du Secrétariat de la Société des Nations = Weekly epidemiological record / Health Section of the Secretariat of the League of Nations**, v. 86, n. 6, p. 45–50, 2011.

JITTIMANEE, J.; WONGBUTDEE, J. Prevention and control of leptospirosis in people and surveillance of the pathogenic *Leptospira* in rats and in surface water found at villages. **Journal of Infection and Public Health**, v. 12, n. 5, p. 705–711, 2019.

JORGE, S. et al. Human and animal leptospirosis in Southern Brazil: A five-year retrospective study. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 18, p. 46–52, 2017.

JOUGLARD, S. D. D.; BROD, C. S. Leptospirose em cães: prevalência e fatores de risco no meio rural do Município de Pelotas, RS. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 67, n. 2, p. 181–185, 2000.

KNÖPFLER, S. et al. Evaluation of clinical, laboratory, imaging findings and outcome in 99 dogs with leptospirosis. **Journal of Small Animal Practice**, v. 58, n. 10, p. 582–588, 2017.

KO, A. I. et al. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador

Leptospirosis Study Group. **Lancet (London, England)**, v. 354, n. 9181, p. 820–5, 1999.

KUPEK ET. AL. The relationship between rainfall and human leptospirosis in Florianópolis, Brazil, 1991-1996. **The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 4, n. 3, p. 131–134, 2000.

LATOSINSKI, G. S. et al. Serological and molecular detection of *Leptospira* spp in dogs. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 3, p. 364–367, 2018.

LEE, H. S. et al. Signalment changes in canine leptospirosis between 1970 and 2009. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 28, n. 2, p. 294–299, 2014.

LEVETT, P. N. Leptospirosis Leptospirosis. **Clinical microbiology reviews**, v. 14, n. 2, p. 296–326, 2001.

LOPES, A.L.S.; SILVA, W.B.; PADOVANI, C.R.; LANGONI, H.; MODOLO, J. R. Frequência sorológica antileptospírica em cães: sua correlação com roedores e fatores ambientais, em área territorial urbana. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 3, p. 289–296, 2005.

MAGALHÃES, D. F. et al. Perfil dos cães sororreagentes para aglutininas anti-*Leptospira interrogans* em Belo Horizonte, Minas Gerais, 2001/2002. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 5, p. 1326–1329, 2007.

MARTIN, L. E. R. et al. Vaccine-associated leptospira antibodies in client-owned dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 28, n. 3, p. 789–792, 2014.

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

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

MILLER, M. D. et al. Variability in Results of the Microscopic Agglutination Test in Dogs with Clinical Leptospirosis and Dogs Vaccinated against Leptospirosis. p. 426–432, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de vigilância em saúde 3ª edição**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Brasília, 2019.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Fragmentação de Ecossistemas: Causas, Efeitos sobre a Biodiversidade e Recomendações de Políticas Públicas. p. 510, 2003.

MIOTTO, B. A. et al. Molecular and serological characterization of the first *Leptospira santarosai* strain isolated from a dog. **Acta Tropica**, v. 162, p. 1–4, 2016.

MIOTTO, B. A. et al. Prospective study of canine leptospirosis in shelter and stray dog populations: Identification of chronic carriers and different *Leptospira* species

infecting dogs. **PLoS ONE**, v. 13, n. 7, p. 1–23, 2018a.

MIOTTO, B. A. et al. Diagnosis of acute canine leptospirosis using multiple laboratory tests and characterization of the isolated strains. **BMC Veterinary Research**, v. 14, n. 1, p. 1–9, 2018b.

MOORE, G. E. et al. Adverse events diagnosed within three days of vaccine administration in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 227, n. 7, p. 1102–1108, 2005.

MURILLO, A. et al. Leptospira detection in cats in Spain by serology and molecular techniques. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 5, 2020.

MUSSO, D.; SCOLA, B. LA. Laboratory diagnosis of leptospirosis: A challenge. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 46, n. 4, p. 245–252, 2013.

NILOOFA, R. et al. Diagnosis of leptospirosis: Comparison between microscopic agglutination test, IgM-ELISA and IgM rapid immunochromatography test. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–12, 2015.

NUNES et al. Prevalência de leptospirose em cães errantes apreendidos no município do Rio De Janeiro-Rj . **Agropecuária Técnica**, v. 30, n. January 2001, p. 48–50, 2009.

OIE - WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. Leptospirosis. **OIE Terrestrial Manual**, Chapter 3.1.12, 2018.

OLIVEIRA et al. Reservatórios Animais Da Leptospirose: Uma Revisão Bibliográfica. **Saúde (Santa Maria)**, v. 39, n. 1, p. 9–20, 2013.

OLIVEIRA et al. Saúde. Doença : as consequências da falta de saneamento básico Health. Disease : the consequences of poor sanitation. **INTESA - Informativo Técnico do Semiárido (Pombal-PB)**, v. 9, n. 2, p. 23–29, 2015.

OLIVEIRA LAVINSKY, M. et al. Seroprevalence of anti-Leptospira spp. antibodies in dogs in Bahia, Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 106, n. 1, p. 79–84, 2012.

OMS. Report of the Second Meeting of the Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group. **World Health Organization**, 2011.

PEREIRA, M. M. et al. A road map for leptospirosis research and health policies based on country needs in Latin America. **Revista Panamericana de Salud Pública**, p. 1–9, 2017.

PINTO ET AL. A systematic review of leptospirosis on dogs, pigs, and horses in Latin America. **Tropical Animal Health and Production**, v. 49, n. 2, p. 231–238, 2017.

PREFEITURA MUNICIPAL DE FRANCO DA ROCHA. Disponível em: <http://www.francodarocha.sp.gov.br/>. Acesso em: 12 de janeiro de 2020.

RAGHAVAN ET AL. Evaluations of hydrologic risk factors for canine leptospirosis: 94 cases (2002-2009). **Preventive Veterinary Medicine**, v. 107, n. 1–2, p. 105–109,

2012.

RICARDO ET AL. Meta-analysis of risk factors for canine leptospirosis. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 181, p. 105037, 2020.

ROBBINS, H. Adverse events in dogs given *Leptospira* vaccine. **Veterinary Record**, v. 180, n. 10, p. 257, 2017.

SANTAROSA, C. A.; SULZER, C. R.; YANAGUITA, R. M. Leptospirosis in wildlife in Brazil: isolation of serovars canicola, pyrogenes and grippotyphosa. **International Journal of Zoonoses**, v.7, n.1, p.40-43, 1980.

SANTOS, N. Infestação por roedores no ambiente urbano : O papel das deficiências ambientais na transmissão da leptospirose. **Anais do III Congresso Latino Americano de Ecologia**, p. 1–4, 2009.

SCHNEIDER, M. C. et al. Leptospirose preocupa a Região das Américas. **Revista CFMV**, Brasília, DF, Ano XX, n. 62, p. 12-17, 2014.

SCHNEIDER, M. C. et al. Leptospirosis in Rio Grande do Sul, Brazil: An Ecosystem Approach in the Animal-Human Interface. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 11, p. 1–20, 2015.

SCHNEIDER, M. C. et al. Leptospirosis in Latin America: exploring the first set of regional data Suggested citation. **Rev Panam Salud Publica Pan American Journal of Public Health**, v. 41, p. 1–9, 2017.

SCHULLER, S. et al. European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats. **Journal of Small Animal Practice**, v. 56, n. 3, p. 159–179, 2015.

SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO - INSTITUTO DE SAÚDE. **Situação de Saúde do Município de Franco da Rocha (SP)**. São Paulo/SP, 2014. Disponível em: <http://saude.sp.gov.br/resources/instituto-de-saude/homepage/aprimoramento/relatoriosituacaosaudefrancorocha2014.pdf>. Acesso em 20/06/2019.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO. Documento técnico: **PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DA LEPTOSPIROSE NO ESTADO DE SÃO PAULO PERÍODO DE 2007 A 2017**, São Paulo, SP, 2017. Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/doc/lepto/lepto0717_perfil_epidemiologico.pdf. Acesso em: 14/04/2020.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Dados Estatísticos—Secretaria da Saúde—Governo do Estado de São Paulo - CVE - Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac"**, São Paulo, SP, 2020. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica-prof.-alexandre-vranjac/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/agrivos/leptospirose/dados-estatisticos> . Acesso em 14/04/2020.

SNIRH - Sistema Nacional de Informações sobre Recursos hídricos. Disponível em: <http://www.snirh.gov.br/>. Acesso em: 28 de junho de 2020.

SUEPAUL, S. M. et al. Seroepidemiology of leptospirosis in livestock in Trinidad. **Tropical Animal Health and Production**, v. 43, n. 2, p. 367–375, 2011.

VIEGAS ET. AL. Investigação sorológica para leptospirose em cães errantes na cidade de Salvador Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 2, n. 1, p. 21–30, 2001.

VIJAYACHARI P. et al. Leptospirosis: an emerging public health problem. **Relevé épidémiologique hebdomadaire / Section d'hygiène du Secrétariat de la Société des Nations = Weekly epidemiological record / Health Section of the Secretariat of the League of Nations**, v. 86, n. 6, p. 45–50, 2011.

VINCENT A.T. et al. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 5, 2019.

WHO. **Current problems in leptospirosis research: report of a WHO expert group**, 1967.

WHO - World Health Organization. **Report of the second meeting of leptospirosis burden epidemiology reference group**. Geneva: World Health Organization; p. 1–34, 2011.