

UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO

Curso de Medicina Veterinária

Julia Teixeira Narimatsu

**LEPTOSPIROSE EM CÃES ATENDIDOS NO PROGRAMA DE
CONTROLE POPULACIONAL ANIMAL: INQUÉRITO SOROLÓGICO E
CONFIRMAÇÃO DA INFECÇÃO POR ISOLAMENTO E PCR.**

São Paulo

2016

Julia Teixeira Narimatsu

**LEPTOSPIROSE EM CÃES ATENDIDOS NO PROGRAMA DE
CONTROLE POPULACIONAL ANIMAL: INQUÉRITO SOROLÓGICO E
CONFIRMAÇÃO DA INFECÇÃO POR ISOLAMENTO E PCR.**

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 Gonçalves.

São Paulo

2016

Narimatsu, Julia Teixeira

LEPTOSPIROSE EM CÃES ATENDIDOS NO PROGRAMA DE
CONTROLE POPULACIONAL ANIMAL: INQUÉRITO SOROLÓGICO
E CONFIRMAÇÃO DA INFECÇÃO POR ISOLAMENTO E PCR / Julia
Teixeira Narimatsu. -- São Paulo , 2016
56 f.

TCC Graduação (Medicina Veterinária) - Universidade de Santo
Amaro, 2016

Orientador(a): Amane Paldês Gonçalves

1.Leptospirose canina. 2.Zoonose. 3.Diagnóstico. 4.Controle
populacional. I.Gonçales, Amane Paldês , orient. II.Universidade de
Santo Amaro III.Titulo

JULIA TEIXEIRA NARIMATSU

**LEPTOSPIROSE EM CÃES ATENDIDOS NO PROGRAMA DE
CONTROLE POPULACIONAL ANIMAL: INQUÉRITO SOROLÓGICO E
CONFIRMAÇÃO DA INFECÇÃO POR ISOLAMENTO E PCR.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade de Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título em Bacharel e Medicina Veterinária. Orientador: Profª. Dr. Amane Paldês Gonçalves.

São Paulo, de de 20.....

Banca Examinadora

.....

Prof. Dr.

.....

Prof. Dr.

| |
|-----------------------|
| <p>Conceito Final</p> |
|-----------------------|

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que me proporcionou a oportunidade de viver esta vida.

Ao meu pai, que me colocou em primeiro lugar na sua vida, buscando o melhor pra mim, me ajudando e apoiando na realização dos meus sonhos.

A minha mãe, que sempre me guiou e esteve presente em meu coração.

Aos meus familiares e amigos que sempre acreditaram em mim e me deram palavras de conforto em momentos difíceis.

À minha orientadora que esteve presente em toda elaboração deste trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.

"Jamais creia que os animais sofrem menos do que os humanos. A dor é a mesma para eles e para nós. Talvez pior, pois eles não podem ajudar a si mesmos."

Dr. Louis J. Camuti

RESUMO

Visando conhecer a prevalência de aglutininas séricas antileptospiras e avaliar a condição de portador renal de leptospiras foi realizado um inquérito sorológico para leptospirose e tentativa de isolamento e PCR em 150 cães que participaram do Programa de Controle Populacional Animal da Universidade de Santo Amaro (PROCOPA) na zona Sul do município de São Paulo. As colheitas de sangue dos animais e a aplicação de questionários foram realizadas após o aceite dos proprietários e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. A prevalência da leptospirose canina encontrada foi de 16% de acordo com o teste de Soroaglutinação Microscópica (SAM) frente a uma bateria de 24 sorovares da *Leptospira interrogans*. Em 41,6% dos animais testados o sorovar Butembo foi o mais prevalente, seguido do sorovar Pomona estirpe GR6 16,6%. Na avaliação da leptospirose realizada nas amostras de urina por meio da pesquisa do DNA de leptospiras pela técnica de PCR e isolamento de leptospiras em meio de cultivo Fletcher não foram obtidos resultados positivos. A partir do presente estudo foi possível confirmar que os cães atendidos pelo PROCOPA estavam expostos a vários sorovares de *Leptospira* spp. podendo servir de infecção para o homem.

Palavras-chave: Leptospirose canina, diagnóstico, zoonose, controle populacional

ABSTRACT

Aiming to know the prevalence of serum agglutinins antileptospire and evaluate the renal carrier of leptospire was carried out a serological survey, attempt to isolate e PCR in blood and urine from 150 dogs that participated the Animal Population Control Program of the University of Santo Amaro (PROCOPA) in the southern zone of the city of São Paulo. The blood collection of the animals and the application of questionnaires were carried out after the acceptance of the owners and signature of the term of the free and informed consent. The prevalence of canine leptospirosis found was 16% according to the Microscopic Soroagglutination (SAM) compared to a battery of 24 serovars of *Leptospira interrogans*. In 41.6% of the tested animals the serovar Butembo was the most prevalent followed by the serovar Pomona strain GR6 16.6%. In the evaluation of leptospiruria performed on urine samples by means of leptospiras DNA research by the PCR technique and isolation of leptospire in the medium Fletcher's cultivation weren't obtained positive results. From the present study it was possible to confirm that the dogs treated by PROCOPA were exposed to several serovars of *Leptospira* spp. and may be an infection for man.

Keyword: Canine leptospirosis, diagnosis, zoonosis, population control

Lista de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1- Inquéritos sorológicos realizados no Brasil, no decorrer dos anos de 2005 a 2015 com os sorovares mais frequentes em cães | 15 |
| Tabela 2- Relação entre sorovares de leptospiros e os hospedeiros de manutenção mais frequentes..... | 17 |
| Tabela 3- Coleta e conservação de materiais para diagnóstico da leptospirose humana | 27 |
| Tabela 4- Antibióticos usados no tratamento da leptospirose, dose, via de administração, intervalo e período..... | 28 |
| Tabela 5- Resultado de amostra de soro de cães submetidos à prova de soroaglutinação microscópica para leptospirose, segundo sorovar mais prevalente, sem a presença de coaglutinações na titulação máxima..... | 40 |
| Tabela 6- Soropositividade dos animais estudados segundo as variáveis aplicadas do questionário epidemiológico | 41 |

Lista de Figuras

- Figura 1- Microscopia eletrônica mostrando a morfologia espiralada e terminação em formato de gancho da *Leptospira interrogans*. 16
- Figura 2- Ciclo de transmissão..... 18
- Figura 3- Cronologia da infecção por *Leptospira* spp. esquematizado em função da imunidade do hospedeiro. 19
- Figura 4- Representação dos setores censitários, tipificados em urbanos (comuns e subnormais) rurais e especiais e a proximidade com o Hospital Veterinário da Universidade de Santo Amaro – São Paulo – 201633

Lista de quadros

| | |
|---|----|
| Quadro 1- Relação dos sorovares de leptopiras utilizadas como antígenos na reação de Soroaglutinação Microscópica aplicada ao diagnóstico de leptospirose, São Paulo - 2016 | 38 |
|---|----|

SUMÁRIO

| | | |
|-----|------------------------------|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 13 |
| 1.1 | Conceituação | 13 |
| 1.2 | Etiologia | 15 |
| 1.3 | Patogenia | 18 |
| 1.4 | Manifestações Clínicas | 20 |
| 1.5 | Diagnóstico | 22 |
| 1.6 | Tratamento | 28 |
| 1.7 | Controle e Profilaxia | 29 |
| 1.8 | Justificativa | 32 |
| 2 | OBJETIVOS | 34 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS | 35 |
| 4 | RESULTADOS | 39 |
| 5 | DISCUSSÃO | 43 |
| 6 | CONCLUSÃO | 47 |
| | REFERÊNCIAS | 48 |
| | APÊNDICE A..... | 56 |
| | APÊNDICE B..... | 57 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Conceituação

A leptospirose é uma doença bacteriana amplamente distribuída, causada por várias espécies e mais de 200 sorovares de *Leptospira* spp. patogênicas^{1,2}. Essa doença acomete o homem, os animais domésticos, selvagens e sinantrópicos e tem importância tanto na área de saúde pública quanto veterinária³. A leptospirose é considerada uma das zoonoses mais difundidas no mundo, considerada um grave problema de saúde pública, principalmente em países tropicais, pois climas quentes e estações chuvosas favorecem a transmissão e a manutenção do agente no ambiente^{4,1}.

Atualmente, a leptospirose está relacionada a áreas urbanas, principalmente às grandes cidades, aonde a ocorrência da doença vem crescendo devido agravamento das condições de vida urbana, caracterizadas pelo crescimento intenso e desordenado, segregação socioeconômica, proliferação de roedores, acúmulo de lixo e pelas grandes enchentes, que propiciam um ambiente ideal para transmissão da leptospirose. Nestas áreas torna-se de extrema importância a realização de estudos baseados na vigilância epidemiológica⁵⁻⁸.

Além de ser um problema de saúde pública, a leptospirose assume considerável importância econômica, pois acomete os animais de produção ocasionando queda na produção de leite, falhas reprodutivas como infertilidade, abortamento, natimortalidade, morte neonatal e custos com tratamento veterinário, esse sendo o único prejuízo presente nos cães².

A doença possui sinônimas dependendo da espécie que pode acometer. Quando acomete o homem pode ser conhecida como Doença de Weil, Doença dos porquinhos, Febre dos arrozais, Febre dos canaviais e Febre dos Pântanos. Quando acomete o cão de Doença de Stuttgart e Tifo canino⁹.

Os animais são considerados os hospedeiros primários ou de manutenção, aos quais se atribui a persistência do ciclo enzoótico da leptospirose. Já os seres humanos são os hospedeiros terminais e acidentais, mas sem importância na

disseminação do agente. Quando se trata de risco de infecção ao homem a exposição ocupacional é a que representa maior dimensão, pois resulta do contato do homem com material ou animal infectado, nesse tipo de exposição podemos citar como grupo de risco garis, agricultores, veterinários, catadores de lixo, militares, técnicos de matadouros e bombeiros. Outros tipos de exposição que também oferecem risco à saúde humana é a exposição recreativa, como eventos de esporte e competição em ambientes quentes, como os esportes aquáticos, entre eles canoagem e natação. Há também a exposição ligada a atividades do cotidiano que pode ocorrer em regiões de ambiente tropical, como andar descalço em ambientes com pouca higiene e jardinagem sem o uso de proteção adequada^{1,10}.

Como a grande maioria das zoonoses, os grupos mais afetados são os carentes em educação e saúde, principalmente populações de baixa renda que vivem em condições inadequadas de saneamento básico que acabam expostas a ambientes contaminados com urina de roedores ou de outros animais infectados^{11,9}.

Segundo o Ministério da Saúde (MS) nos anos de 2000 a 2015 foram confirmadas 60.317 casos humanos, sendo a maior ocorrência nas regiões Sul e Sudeste, com 19.059 e 20.721 casos respectivamente. A cidade de São Paulo apresentou 12.337 casos nesse mesmo período¹². De acordo com o Guia de Vigilância epidemiológica¹³ também do MS, trata-se de uma doença de alta letalidade, de 40% nos casos graves.

Um estudo realizado no período de 2001 a 2003 pelo MS no Brasil, a partir dos casos de leptospirose humana, mostrou que em 55% dos casos o provável local de infecção foi o domicílio, seguido do ambiente de trabalho (32%) e das situações de lazer (13%). Quando considerado apenas o meio rural/silvestre, obteve-se que 54% dos casos ocorreram no ambiente de trabalho, 28% no domicílio e 17% em situações de lazer¹³.

Em diversas regiões do país são realizadas inquéritos sorológicos com a finalidade de analisar a variação e distribuição dos sorovares de *Leptospira* spp. nos animais, mas principalmente nos cães, já que eles compartilham e servem como reservatório de sorovares capazes de infectar e levar a doença no homem, como Icterohaemorrhagiae, Canicola e Copenhageni^{7,9}. Observa-se na Tabela 1,

prevalências para leptospirose e os sorovares mais encontrados em diversos inquéritos sorológicos realizados no Brasil.

Tabela 1- Inquéritos sorológicos realizados no Brasil, no decorrer dos anos de 2005 a 2015 com os sorovares mais frequentes em cães

| Localidade | Referência | Nº de Amostras | Prevalência | Sorovares mais frequentes |
|-----------------------|-------------------------------|----------------|-------------|--|
| Curitiba- PR | Tesserolli ¹⁴ | 399 | 28,57% | Copenhageni Canicola Icterohaemorrhagiae |
| Botucatu- SP | Modolo et al. ¹⁵ | 775 | 15,3% | Canicola Pyrogenes Autumnalis |
| Parelheiros- SP | Sarmento et al. ¹⁶ | 90 | 6,6% | Canicola Icterohaemorrhagiae Pyrogenes |
| Londrina- PR | Benitez, et al. ¹⁷ | 33 | 21,21% | Canicola Pyrogenes Castellonis |
| Umuarama- PR | Dreer et al. ¹⁸ | 175 | 20% | Canicola Bratislava Tarassovi |
| Belém e Castanhal- PA | Paz et al. ¹⁹ | 311 | 17,5% | Canicola Patoc Icterohaemorrhagiae |

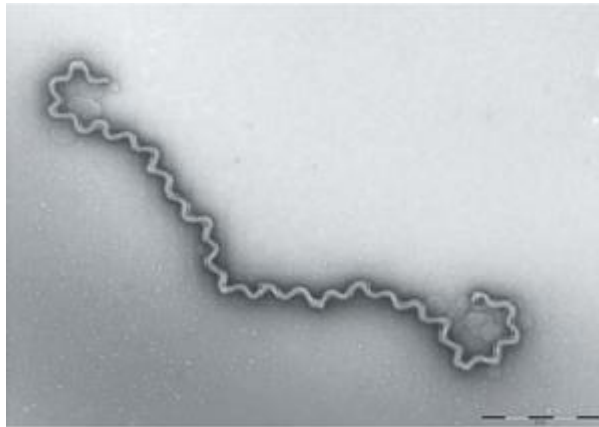
Fonte: Elaborada pelo autor.

1.2 Etiologia

A leptospirose é causada por bactérias do gênero *Leptospira*, gênero pertencente a família *Leptospiraceae* e a ordem *Spirochaetales*, que inclui também os gêneros *Borrelia* e *Treponema*, agentes causadores da doença de Lyme e da Sífilis, respectivamente²⁰. São espiroquetas helicoidais, finas, longas com aproximadamente 10 a 20 mm de comprimento, possuem ganchos e dois flagelos um em cada extremidade. Estes garantem sua mobilidade tanto em ambiente aquoso quanto gelatinoso e facilitam sua penetração no tecido dos animais^{2,1}. As estruturas de superfície das leptospiras compartilham características tanto de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas²¹. Sua membrana externa é composta

de lipopolissacarídeos (LPS) porções de proteínas, lipídeos e diversos antígenos. Não são visualizadas à luz direta, mas podem ser visualizadas por microscopia de campo escuro ou contraste de fase e em microscópio óptico se coradas pela prata^{2,1}.

Figura 1- Microscopia eletrônica mostrando a morfologia espiralada e terminação em formato de gancho da *Leptospira interrogans*.



Fonte: Musso & Lascola²²

Atualmente, há dois tipos de classificação taxonômica para o gênero *Leptospira*, um baseado em determinantes antigênicos a partir de reações de aglutinação, que resulta na determinação de diferentes sorovares os quais são distinguidos pela heterogeneidade estrutural dos carboidratos do LPS e outro baseado em determinantes genéticos a partir de análises de sequenciamento do gene 16S, que resulta em diferentes espécies genômicas²³.

Segundo suas características genotípicas, até o momento, foram determinadas 21 genomoespécies de leptospiros distribuídas entre patogênicas intermediárias e saprófitas: *L. alexanderi*, *L. alstonii*, *L. biflexa*, *L. borgpetersenii*, *L. broomii*, *L. fainei*, *L. idonii*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. kmetyi*, *L. licerasiae*, *L. meyeri*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. terpstrae*, *L. vanthielii*, *L. weilii*, *L. wolbachii*, *L. wolffii*, *L. yanagawae*, *Turneriella parva* e *Leptonema illin*²³.

Segundo a classificação sorológica a espécie causadora da doença é a *Leptospira interrogans*, que compreende todas as estirpes patogênicas tanto para o

homem quanto para os animais. Esta classificação possui cerca de 200 sorovares e cada espécie de animal pode ser reservatório ou hospedeiro de manutenção de um ou mais sorovares^{24,9,25,2}.

No meio urbano, o principal reservatório da leptospirose são os roedores sinantrópicos *Rattus norvegicus*, *Rattus rattus* e *Mus musculus* (rato de esgoto, rato de telhado e camundongo, respectivamente)¹. Os cães, após os roedores, são considerados a principal fonte de infecção para os seres humanos devido ao estreito contato com os mesmos e pela possibilidade de eliminarem leptospiras vivas através da urina durante meses, mesmo na ausência de manifestações clínicas² (Tabela 2).

Tabela 2- Relação entre sorovares de leptospiras e os hospedeiros de manutenção mais frequentes

| Sorovares | Reservatório |
|---------------------|---------------------------|
| Bratislava | Rato, porco e cavalo |
| Autumnalis | Rato |
| Icterohaemorrhagiae | Rato |
| Pomona | Vaca, porco, gambá |
| Canicola | Cão |
| Batavia | Cão, rato |
| Hardjo | Vaca, ovinos |
| Australis | Rato |
| Zanoni | Rato |
| Grippotyphosa | Ratazana, guaxinim, gambá |
| Copenhageni | Rato |
| Wolffi | Morcegos |

Fonte: Adaptada de Greene et al.²⁶.

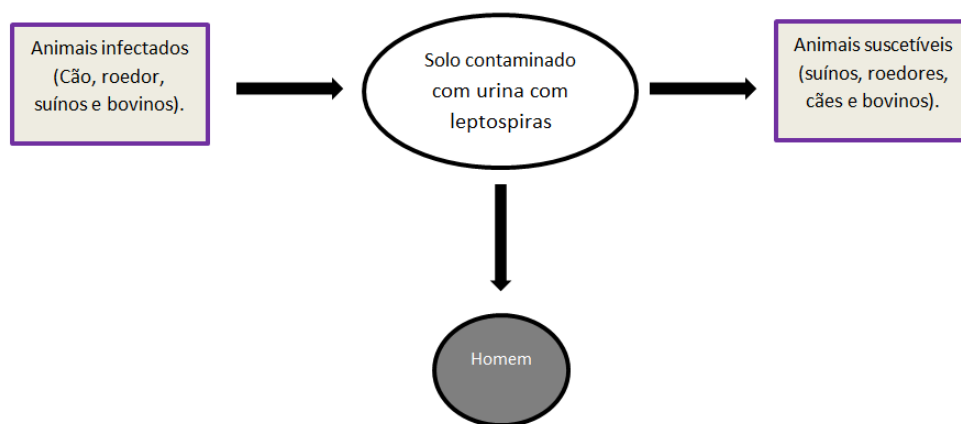
As bactérias do gênero *Leptospira* spp. são aeróbias, exigentes quanto às concentrações atmosféricas de oxigênio e dióxido de carbono. Sua temperatura ótima de crescimento é entre 28 a 30°C e o pH em torno de 7,2 a 7,4. No ambiente,

podem sobreviver em terrenos úmidos, córregos, lagos, pântanos e estábulos por até seis meses. São sensíveis a ambientes secos, temperaturas baixas ou altas, dessecação e pH ácido^{2,27,25,28}.

1.3 Patogenia

De acordo com Faine² os mecanismos de patogenia são semelhantes entre os suscetíveis, sejam eles animais de qualquer espécie, inclusive o homem. Estes mecanismos baseiam-se em conseguir penetrar, sobreviver às barreiras de defesa do hospedeiro, se multiplicar, produzir toxinas, ativar a resposta imune do hospedeiro para que assim não ocorra doença em uma reinfecção pelo mesmo sorovar.

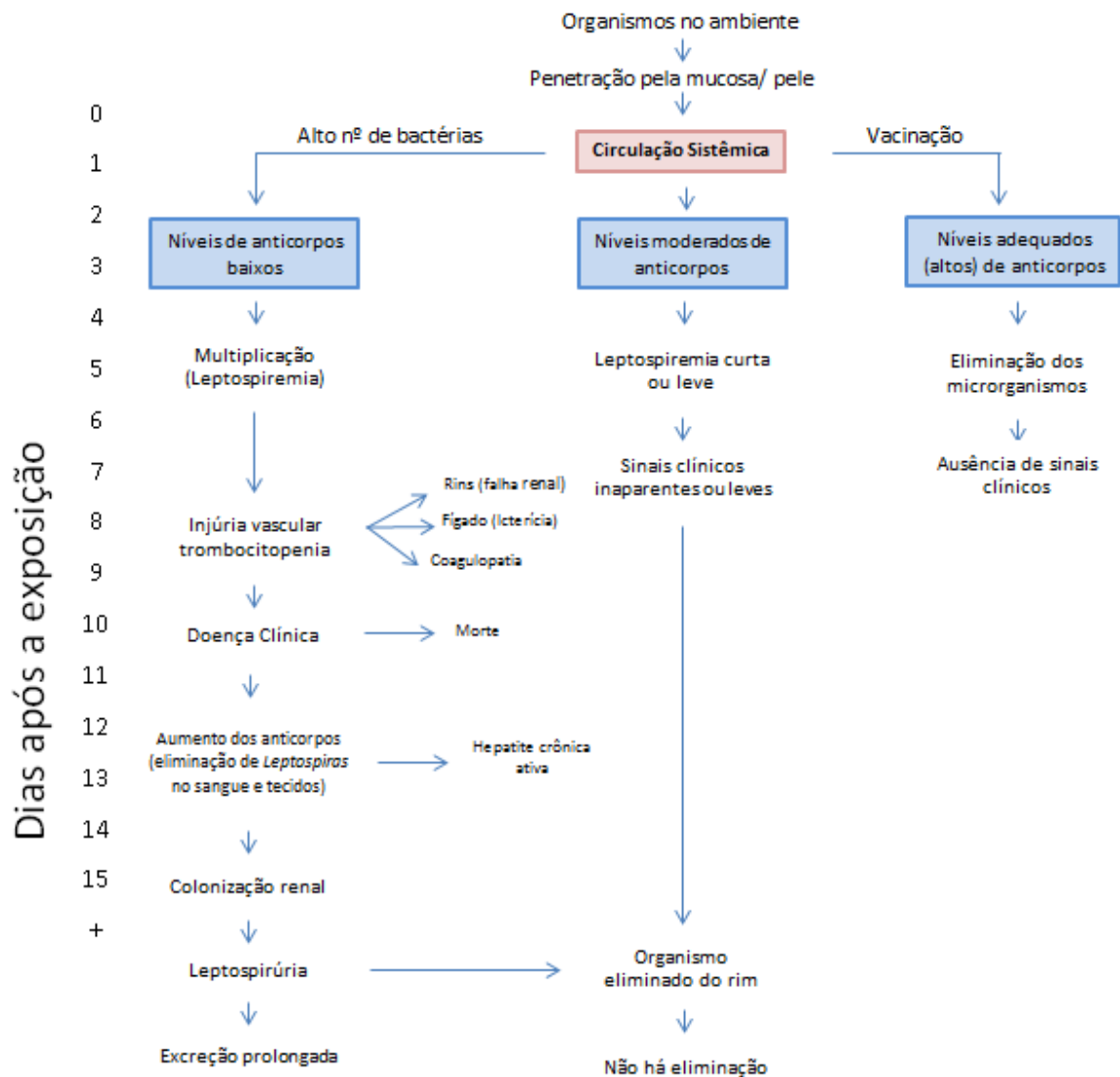
Figura 2- Ciclo de transmissão.



Fonte: Adaptado de Acha & Szyfres⁹.

A habilidade de causar doença está relacionada às condições de virulência do agente, ao sorovar infectante e a capacidade de conseguir ultrapassar as barreiras de defesa do hospedeiro²⁹ (Figura 3).

Figura 3- Cronologia da infecção por *Leptospira* spp.



Fonte: Adaptado de Greene et al.²⁶.

Ao entrar em contato com o hospedeiro a bactéria penetra de forma ativa através das mucosas, ocular, digestiva, respiratória e genital, pele lesionada ou íntegra, em situações onde os poros possam estar dilatados, como quando imersos em água³⁰. Após a penetração e um período de incubação de quatro a dez dias, a bactéria se multiplica no sangue, linfa e líquido, caracterizando a primeira fase (leptospiremia), que dura em torno de sete dias, podendo causar um quadro de septicemia aguda. As primeiras lesões são causadas pela mecânica do agente em

células endoteliais dos vasos sanguíneos. A consequência direta destas lesões são as hemorragias, seguidas da formação de trombos e coagulação intravascular. As manifestações clínicas irão depender dos órgãos que serão afetados e da extensão das lesões^{32,31}.

Caso o mecanismo de defesa do hospedeiro permita que a bactéria resista à primeira fase de infecção, o hospedeiro chegará à segunda fase clínica que é caracterizada pela atividade imunológica e leptospirúria devido à colonização dos túbulos proximais renais. As leptospirosas podem persistir nos rins e serem eliminadas na urina por semanas ou meses, de forma intermitente^{1,26, 6,33}.

De acordo com Adler & Monteczuma²⁷ as primeiras lesões ocorrem no fígado e nos túbulos renais, levando à necrose por isquemia e insuficiência desses órgãos e, na maioria dos casos, levam a hemorragias por deficiência de plaquetas e icterícia.

De acordo com Monahan et al.¹⁰ as alterações renais dependem do tipo de hospedeiro, se é hospedeiro de manutenção ou hospedeiro acidental. No hospedeiro acidental a doença geralmente é mais grave e de curso agudo, enquanto no hospedeiro mantenedor ela é menos severa e com curso crônico.

A transmissão ocorre de animal para animal e do animal para o homem (antropozoonose) e pode ser de forma direta através de sangue, urina, tecidos e órgãos infectados ou de forma indireta através do ambiente contaminado com urina de animais infectados³⁴.

1.4 Manifestações Clínicas

As manifestações clínicas da leptospirose podem ser características e sugestivas, mas não são patognomônicas e diferem no o cão e o homem.

1.4.1 Leptospirose Humana

No homem os sinais clínicos, de acordo com Levett¹ e Brasil¹¹ são caracterizados por duas formas de apresentação:

- Anictérica: normalmente com apresentação clínica ou subclínica. Inicialmente, esta forma apresenta-se como uma doença febril súbita, com sintomas inespecíficos, como dor de cabeça, mialgia, dor abdominal, hiperemia conjuntival e exantema cutâneo. A febre pode ter caráter intermitente com resolução em três a quatro dias. Essa forma de apresentação pode durar até uma semana e possui baixa mortalidade.

- Ictérica: essa apresentação possui caráter mais grave e com progressão rápida. A icterícia aparece em três a sete dias após o início dos sintomas caracterizando a síndrome de Weil. Nesta forma diversos órgãos podem ser acometidos, mas geralmente ocasiona insuficiência renal aguda, necrose hepatocelular, trombocitopenia e coagulação intravascular disseminada.

Outro órgão que tem mostrado importância na manifestação da doença é o pulmão, que pode levar a tosse, dispneia, hemoptise, síndrome de estresse respiratório agudo e a síndrome pulmonar hemorrágica da leptospirose (SPHL). Nesta apresentação clínica, a mortalidade é elevada.

1.4.2 Leptospirose Canina

A intensidade e severidade da doença pode variar de acordo com o estado de vacinação do cão, idade, virulência do sorovar, grau de exposição à doença e resposta imune do hospedeiro. Alguns animais podem desenvolver os sinais clínicos mais graves da doença que podem levar a óbito. Enquanto outros podem debelar a infecção sem ao menos demonstrar os sintomas da doença¹.

Os sinais clínicos mais comuns entre os animais são: febre acima de 40°C, insuficiência renal, insuficiência hepática, uveíte, hemorragia pulmonar, hemoglobinúria, diarreia, êmese, mal estar, anorexia, depressão, mucosas pálidas ou ictéricas e hiperemia conjuntival^{1,35,26}.

A infecção pelo sorovar *Icterohaemorrhagiae* causador da forma hepatonefrítica ou Doença hemorrágica aguda de evolução rápida (24 a 48 horas). Estas formas são geralmente fatais devido à insuficiência hepática e renal severa, caracterizadas por icterícia e uremia, respectivamente. O cão pode apresentar anúria, oligúria ou poliúria, dependendo do grau de comprometimento renal. A evolução aguda é mais comum em animais jovens e a icterícia nem sempre é observada^{28,1}.

O sorovar *Canicola* conhecido por causar a forma nefrítica, que se caracteriza por um maior comprometimento renal, ocasionando uremia e suas consequências, como gastrite, úlceras na cavidade oral e alterações gastroentéricas. Este sorovar, geralmente não causa a forma ictérica e em alguns casos a infecção pode ser inaparente. No entanto, devido a eliminação da bactéria por longos períodos e de forma crônica pode levar a uma falência renal com o passar dos anos^{28,1}.

Quanto ao prognóstico, Faine² relata que a maioria dos pacientes é capaz de se recuperar entre duas a seis semanas desde que não esteja acometido pela forma ictérica. Para Megid et al.³⁶ existem alguns fatores que podem piorar o prognóstico como idade avançada dos animais, acometimento pulmonar e insuficiência renal com oligúria.

1.5 Diagnóstico

Os exames laboratoriais possuem extrema importância, pois nenhuma manifestação clínica é específica da leptospirose, o que torna difícil o diagnóstico clínico. Portanto, o diagnóstico da leptospirose apoia-se fundamentalmente nos resultados obtidos em exames laboratoriais realizados por meio da pesquisa do

agente etiológico na amostra ou de anticorpos humorais induzidos pelo mesmo^{37, 38, 27, 11}.

Para realização de exames podem ser coletadas amostras de sangue, urina, líquido cefalorraquidiano ou de tecidos durante a necropsia^{22,2,1}.

Exames laboratoriais de rotina, hematológicos, bioquímicos e de urina são inespecíficos, mas podem apresentar alterações sugestivas da doença. Nestes exames, pode-se encontrar leucocitose, neurofilia, monocitose, uremia e alterações em enzimas hepáticas³⁹.

1.5.1 Métodos diretos

Os métodos diretos são capazes de demonstrar as leptospiplas ou seu material genético em amostras de sangue, urina, líquido e tecidos. As amostras de sangue e urina devem ser coletadas durante as fases de leptospiremia ou de leptospirúria, respectivamente. Os métodos mais utilizados são as técnicas de cultivo, inoculação em animais de laboratório, técnicas moleculares e técnicas de visualização das leptospiplas em exame a fresco, através do microscópio de campo escuro, técnicas de coloração pela prata ou, ainda imunofluorescência direta. As técnicas de visualização do agente etiológico são específicas, porém pouco sensíveis^{41, 40}.

Segundo Faine², para se obter um resultado confiável no exame a fresco é necessário que as amostras sanguíneas sejam coletadas durante a primeira semana de infecção até no máximo dez dias. Apesar de ser um exame rápido, devido a sua baixa sensibilidade os resultados podem não ser verdadeiros, se coletado tardiamente.

1.5.1.1 PCR

Dentre os exames diretos e específicos além dos citados acima, há a técnica de PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase) que detecta o DNA do agente etiológico na amostra¹¹.

O uso da PCR vem crescendo para o diagnóstico da leptospirose em diversas espécies de animais e também no homem, devido sua precisão, rapidez, alta especificidade e sensibilidade. Esta técnica detecta e amplifica o DNA da *Leptospira* spp. desde o início da doença e antes mesmo dos anticorpos serem detectados no soro^{40,41,2}. O fato desse método ser incapaz de identificar o sorovar infectante não influencia no diagnóstico e tratamento da doença, uma vez que a identificação do sorovar não é importante no tratamento, mas para o conhecimento da cadeia epidemiológica da doença e para a formulação de vacinas^{1,42}.

Mérien et al.²⁹, demonstrou que a PCR é capaz de diagnosticar a leptospirose em pacientes que já haviam iniciado o tratamento. Dentre as limitações para que a PCR seja realizada como rotina estão os altos custos dos equipamentos e reagentes, além da mão de obra especializada².

1.5.1.2 Cultura

Para o cultivo e crescimento das leptospiros são necessários utilizar meios de cultura específicos como o Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH), Korthof, Stuart, Fletcher, adicionados substâncias que prolongam a sobrevivência das leptospiros e evitam o crescimento de micro-organismos contaminantes. Os cultivos devem ser incubados a uma temperatura entre 28 e 30°C e examinados semanalmente por microscopia de campo escuro durante pelo menos seis semanas para confirmação do diagnóstico^{43,44}. Mesmo sendo uma técnica de diagnóstico confirmatória, não é usada na rotina, por se tratar de um teste com um longo período de incubação (de três a seis semanas), de alto custo e risco aos manipuladores^{45,42}.

1.5.1.3 Inoculação em animais de laboratório

Amostras de sangue, urina ou tecidos de animais ou humanos com suspeita da doença são inoculadas por via intraperitoneal em animais de laboratório suscetíveis ao agente como os hamsters (*Mesocricetus auratus*) e cobaias (*Cavia porcellus*). Após inoculação observa-se o aparecimento das manifestações clínicas como icterícia, hemorragias, hematúria e/ou o óbito dos animais devido a alta suscetibilidade destas espécies a bactéria. As leptospiras podem ser encontradas após três dias nos fluidos e os animais sobreviventes podem se tornar portadores². Este método é mais utilizado para a manutenção de estirpes de leptospiras em laboratórios.

1.5.2 Exames indiretos - Testes sorológicos

Os exames indiretos buscam detectar anticorpos antileptospiras produzidos pelo hospedeiro devido a resposta à infecção pela bactéria. Os métodos indiretos podem ser utilizados tanto em animais quanto em humanos, pois são capazes de detectar anticorpos da classe IgM que aparecem dentro de três a dez dias, nos casos de infecção recente² e anticorpos específicos IgG a partir de cinco a sete dias após início das manifestações clínicas¹.

Existem vários métodos indiretos utilizados no diagnóstico da leptospirose entre eles podemos citar os de aglutinação como a soroaglutinação macroscópica, soroaglutinação microscópica (SAM), hemaglutinação e a aglutinação em látex e os testes de fixação de complemento, ensaio imunoenzimático (ELISA), reação de contra-imunoeletoforese, reação de imunofluorescência, e radioimunoensaio. Porém, entre os acima citados, a técnica de SAM é o teste de referência recomendado pela Organização Mundial de Saúde⁶.

1.5.2.1 Reação de Soroaglutinação Microscópica – SAM

Para o diagnóstico da leptospirose, a Organização Mundial de Saúde (WHO)⁶ recomenda o exame de SAM, considerado teste de referência tanto para o diagnóstico humano quanto animal, no entanto é um procedimento trabalhoso, restrito a alguns laboratórios especializados. Na técnica de SAM o sinal observado é a aglutinação pela presença de aglutininas antileptospiras no soro teste frente a uma coleção de antígenos vivos que devem conter pelo menos um sorovar representante de cada sorogrupo além de estirpes isoladas na região.

As principais desvantagens da técnica são a manutenção das estirpes, risco no manuseio das mesmas e a interpretação dos resultados, pois podem ocorrer reações obtidas para diferentes sorovares em uma mesma amostra. Estas reações múltiplas devem ser interpretadas como coaglutinações, sendo uma condição relativamente frequente entre sorovares pertencentes a um mesmo sorogrupo ou, até mesmo com membros de sorogrupos distintos que possuem grande semelhança antigênica. Por outro lado, títulos baixos podem ser indicativos de uma fase adiantada da doença, onde o animal pode se encontrar em imunossupressão ou já ter iniciado a antibioticoterapia^{6,25,28}.

Segundo Faine² para a correta interpretação dos resultados na sorologia deve ser considerada a situação epidemiológica da região. Em áreas não endêmicas títulos de 100 ou 400 podem ser considerados sororreagentes, entretanto, em áreas endêmicas, um título de 50 associados a uma clínica compatível, indica a leptospirose. Nos casos individuais o ideal é a realização de sorologia pareada com intervalo de quinze dias para os animais sem histórico de vacinação de modo a permitir a caracterização da conversão sorológica. O aumento de quatro vezes o título anterior ou viragem de negativo para positivo indica contato recente, ou seja, infecção ativa, não sendo necessário quando a titulação da primeira amostra for maior ou igual a 800.

1.5.3 Diagnóstico diferencial

Por possuir sintomas inespecíficos em algumas fases da doença, principalmente na forma anictérica, a leptospirose tem como diagnóstico diferencial, em humanos a gripe, dengue, hantavirose, infecções de vias aéreas superiores e inferiores, pielonefrite aguda, toxoplasmose, meningites e febres hemorrágicas. A forma ictérica pode ser diferenciada de hepatites, febre amarela, malária, colangite e septicemias²⁵. Para os cães, os diferenciais estão entre as intoxicações, babesiose, ehrliquiose, anemia hemolítica autoimune e neoplasias hepáticas³⁶.

Tabela 3- Coleta e conservação de materiais para diagnóstico da leptospirose humana

| Tipo de diagnóstico | Tipo de Material | Período da coleta | Recipiente | Conservação |
|----------------------------|-------------------------|---|----------------------------------|---------------------------------------|
| Isolamento | Sangue | Até o 7º dia (fase aguda) | Meio de cultura Fletcher ou EMJH | Estufa a 28°C ou temperatura ambiente |
| Macroaglutinação | Soro | 1ª coleta no primeiro atendimento, se colhido antes do 7º dia do início dos sintomas. 2ª amostra após passado esse período. | Tubo sem anticoagulante | Congelado (-20°C) |
| Microaglutinação | Soro | 1ª amostra no primeiro atendimento; 2ª amostra 2 ou 3 semanas após | Tubo sem anticoagulante | Congelado(-20°C) |
| ELISA - IgM | Soro (sem hemólise) | Após o 7º dia de início dos sintomas | Tubo sem anticoagulante | Congelado(-20°C) |

Fonte: Adaptado de Guia de Vigilância Epidemiológica⁴⁶.

1.6 Tratamento

A terapia de suporte depende da gravidade das manifestações clínicas, pois o animal pode apresentar insuficiência renal ou hepática. Animais em estado grave podem entrar em estado de choque devido à desidratação severa.

Greene et al.²⁶ recomenda a fluidoterapia para reposição hidreletrolítica, em animais com diarreia e vômitos, alimentação enteral ou parenteral, nos que estão em anorexia. Recomenda-se também o uso de antieméticos, avaliação do débito urinário, assistência cardiorrespiratória e transfusão de sangue. Todas essas medidas são paliativas, sendo necessária a administração de antibióticos para eliminar a febre, a leptospiremia e a leptospirúria⁴⁷.

A antibioticoterapia deve ser realizada de acordo com a fase da doença na qual o cão se encontra. Na fase aguda devem ser utilizados apenas antibióticos capazes de eliminar a leptospiremia como a Ampicilina, Penicilina G, Ampicilina associada a Enrofloxacina, Amoxicilina associada ao Ácido Clavulânico para não comprometer as possíveis lesões renais. A administração parenteral deve ser realizada nos quadros de vômitos. Após duas semanas usa-se Doxiciclina para eliminar a leptospirúria e assim, a possibilidade deste animal se tornar um portador renal.

Tabela 4- Antibióticos usados no tratamento da leptospirose, dose, via de administração, intervalo e período

| Antibiótico | Dose | Via | Intervalo (Horas) | Duração (Semanas) |
|--------------|---------------------|------------|-------------------|-------------------|
| Penicilina G | 25,999-40,000 U/ kg | IN, SC, IV | 12 | 3 |
| Ampicilina | 22mg/ kg | SC/ IV | 6-8 | 3 |
| | 20-40mg/kg | PO | 8 | 3 |
| Amoxicilina | 10-20mg/kg | PO | 8-12 | 3 |

| | | | | |
|--------------|------------|--------|----|---|
| Doxiciclina | 5mg/kg | PO, IV | 12 | 3 |
| Tetraciclina | 22 mg/kg | PO | 8 | 3 |
| Azitromicina | 5-10 mg/kg | PO | 24 | 3 |

Fonte: Adaptado de Greene et al²⁶.

As cefalosporinas de terceira geração como Ceftriaxona, Cefotaxima e Quinolonas também tem se mostrado efetivas para o tratamento da leptospirose. A penicilina possui efeitos benéficos, capaz de reduzir a mortalidade e a duração da doença em casos severos⁶.

Após o início do tratamento com penicilinas uma reação chamada Jarisch-Herxheimer pode ocorrer⁶. Esta consiste em alterações fisiológicas como aumento de temperatura, vasodilatação e hipotensão. Sua patogênese não está bem elucidada, mas sabe-se que ocorre após liberação de toxinas⁴⁸, apesar desta reação a antibioticoterapia deve ser iniciada.

1.7 Controle e Profilaxia

A prevenção da leptospirose está relacionada diretamente a medidas sanitárias que vão desde controle de roedores, limpeza do ambiente, destino adequado de esgotos, emprego de técnicas de drenagem e de canalização dos cursos de água para eliminar o excesso de água livre, devendo-se restringir o acesso de cães ou pessoas ao ambiente externo em épocas de alto índice pluviométrico, em locais predispostos a enchentes²⁸.

A aplicação de vacinas antileptospiras constitui um dos mais importantes meios de controle da leptospirose em animais. Porém, ressalta-se que somente a vacinação não é capaz de proteger os animais e que para o controle da doença devem ser aplicadas todas as medidas preventivas em conjunto. Estas medidas incluem a identificação das fontes de infecção, medidas voltadas as vias de

transmissão como saneamento do meio, adequada armazenagem de alimentos e desinfecção das instalações e equipamentos e, a imunização sistemática dos suscetíveis^{2,28}.

Quanto às fontes de infecção é necessária identificação dos animais doentes e portadores, efetuada por meio de exames laboratoriais, o tratamento de animais infectados por meio do uso de antibióticos e combate aos reservatórios sinantrópicos⁴⁷.

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. Os cães considerados errantes ou a posse não responsável dos mesmos aumenta o risco de infecção em 3,59 vezes, pelo fato destes animais não serem vacinados contra leptospirose, por formarem bandos quando as fêmeas se encontram no cio e pelo hábito de revirar lixo que podem estar contaminados com a urina de roedores ou animais infectados⁴⁹.

Segundo Greene et al.²⁶ a prevenção baseia-se na eliminação do estado de portador, redução dos animais reservatórios e sua proximidade com o ambiente humano, além da redução de ambientes propícios para a vida dos roedores. Em humanos é utilizado a Doxiciclina em doses baixas em áreas endêmicas.

1.7.1 Imunização

A imunidade conferida pelas vacinas nos animais é basicamente humoral²⁷. Nos cães, pode ser realizada a vacinação com as bacterinas, bactérias inativadas por tratamento térmico ou químico, portanto não oferecem risco ao animal e ao aplicador. Nestas vacinas devem estar presentes os sorovares mais prevalentes para a espécie que será imunizada, pois a maioria dos sorovares não produz imunidade cruzada e, desta forma, o sorovar presente na vacina estimula a produção de anticorpos apenas para o sorovar homólogo ou para aqueles sorovares similares antigenicamente. Para suínos, bovinos e equinos os sorovares mais

utilizados em vacinas são Icterohaemorrhagiae, Canicola, Grippotyphosa, Hardjo, Pomona, Autumnalis e Bratislava. Os sorovares mais utilizados em vacinas para cães no mundo são o Canicola e Icterohaemorrhagiae²⁸. Devido à variedade de sorovares, as vacinas devem ser compostas com os sorovares prevalentes em cada região específica, pois quanto maior o número de antígenos maiores os riscos de reações de hipersensibilidade²⁸.

As vacinas induzem proteção contra a doença clínica, mas nem sempre protegem contra o estado de portador renal⁵⁰. São indicadas a todos os animais que correm risco de exposição, que vivem em áreas que com risco de inundações, alagamentos, ambientes com superpopulação de cães errantes ou que tenham contato com animais selvagens⁴⁵. Atualmente, no Brasil, não existe vacina licenciada para a leptospirose humana⁴⁷.

1.7.2 Educação em saúde

É necessário realizar a educação em saúde da população utilizando informações simples e de fácil entendimento que abordem as formas de transmissão, manifestações clínicas, prevenção e gravidade da doença¹¹, bem como informações sobre a posse responsável dos animais⁴⁹. Este conhecimento não deve ser disponibilizado apenas à população, mas também aos profissionais de saúde como médicos, veterinários, profissionais que tenham contato com a vida selvagem, cientistas entre outros profissionais envolvidos na saúde pública. Estes profissionais devem saber a situação da doença, se ocorrem surtos ou se é endêmica na região onde trabalham, sendo imprescindível que o profissional de uma área endêmica, ou que possua os fatores de risco, saiba reconhecer as manifestações clínicas e os testes diagnósticos que mais se aplicam em cada situação para entrar com o suporte necessário o mais rápido possível^{2,6}.

1.8 JUSTIFICATIVA

Desde 2009 existe no Hospital Veterinário da Universidade de Santo Amaro, um Programa de Controle Populacional Animal (PROCOPA) que visa contribuir com o controle populacional de cães e gatos nas comunidades adjacentes ao Campus I. Estas áreas (Figura 4) apresentam características ecológicas favoráveis, onde é observado o compartilhamento do ambiente por diversas espécies animais, o que pode promover a associação e adaptação de agentes etiológicos a novos hospedeiros, entre os quais a *Leptospira* spp. Características como 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, propiciam o contato da população humana e de animais domésticos com os animais silvestres. Por isso, a avaliação da situação da leptospirose por meio de um levantamento soro epidemiológico da leptospirose canina nesta região será de extrema relevância para o conhecimento da cadeia epidemiológica da doença e essencial para o planejamento de ações de prevenção desta zoonose e de outras ações em saúde pública.

Figura 4- Representação dos setores censitários, tipificados em urbanos (comuns e subnormais) rurais e especiais e a proximidade com o Hospital Veterinário da Universidade de Santo Amaro, São Paulo – 2016.



Fonte: Adaptado de IBGE⁵¹.

2 OBJETIVO

2.1. Objetivo Principal

Tendo em vista a importância da leptospirose canina na saúde pública, o objetivo deste projeto foi o de utilizar o cão atendido pela campanha de esterilização cirúrgica do Hospital Veterinário da Universidade de Santo Amaro como evento sentinela para avaliar a situação da leptospirose na zona Sul do município de São Paulo.

2.2. Objetivos Secundários

- Investigar por meio de inquérito soro epidemiológico a ocorrência de leptospirose na população canina atendida pelo PROCOPA.
- Identificar os sorovares de *Leptospiras* spp. mais frequentes na população canina atendida pelo PROCOPA.
- Contribuir com os estudos dos sorovares mais prevalentes no Brasil, para cada espécie de animal doméstico, com o objetivo de controlar a leptospirose animal por meio de vacinas que contenham na sua composição os sorovares mais prevalentes no país para a espécie em questão.
- Avaliar a condição de portador renal de leptospiras por meio das técnicas de PCR e isolamento em amostras de urina dos cães atendidos pelo programa.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos realizados neste estudo foram autorizados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNISA conforme o parecer nº 50/2015.

3.1 Área do estudo

O presente estudo foi desenvolvido no Hospital Veterinário da Universidade de Santo Amaro, localizado na zona Sul do município de São Paulo, SP.

3.2 População alvo

O estudo foi realizado com os cães atendidos pelo Programa de Controle Populacional Animal (PROCOPA) da Universidade de Santo Amaro.

3.3 Colheita das amostras

As amostras de sangue de 150 cães foram colhidas para a realização da prova de SAM, de modo asséptico por venopunção da jugular, por meio de seringas de 3mL e agulhas pretas (0,7 x 30), e em seguida foram acondicionadas em tubos estéreis de 5mL. As amostras de sangue foram mantidas em temperatura ambiente e posteriormente centrifugadas para a obtenção do soro que foi alíquotado em *eppendorfs* e posteriormente armazenado a 20°C negativos até o momento da realização do sorodiagnóstico para leptospirose. A análise dessas amostras foi

realizada no Laboratório de Zoonoses Bacterianas, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da USP.

Foram coletadas 49 amostras de urina somente das fêmeas, de forma a não prejudicar o fluxograma do PROCOPA, por meio de compressão manual da bexiga. A urina foi coletada diretamente da vulva das cadelas em tubos Falcon estéreis. Neles, uma quantidade de aproximadamente 500 microlitros de urina foi diluída em 4,5mL de Solução Salina de Sorensen. Após a diluição, essas amostras foram inoculadas em meio Fletcher e incubadas a 28°C. Estas permaneceram incubadas por um período de aproximadamente seis semanas, e levadas ao Laboratório de Zoonoses Bacterianas/ USP para confirmação do resultado para observação no microscópio de campo escuro.

Na ocasião da colheita, pós-autorização mediante assinatura do responsável pelo animal (Apêndice A) foi aplicado um questionário epidemiológico, onde foram abordadas questões relacionadas à leptospirose como presença de roedores, contato com áreas alagadas e ocorrência de enchentes, contato com outros animais, acesso à rua e variáveis relacionadas a características individuais dos animais, como raça, sexo, idade e vacinação (Apêndice B).

As amostras de soro foram submetidas a prova de SAM^{52,53,2} utilizando-se uma coleção de 24 sorovares de leptospiros (Quadro 1). As culturas vivas das leptospiros foram mantidas em meio líquido de EMJH modificado⁵⁴, com quatro a quatorze dias de crescimento e uma densidade aproximada de 100 a 200 micro-organismos por campo microscópico, com aumento de 400 vezes. Os soros foram diluídos a 1:50 em solução salina tamponada de Sorensen e a reação foi efetuada em microplacas de poliestireno com 96 poços, com 50 µL de antígeno, a diluição final da mistura soro/antígeno 1:100, sendo este o ponto de corte da reação.

Os soros reagentes na triagem foram novamente testados para a determinação do título final de aglutininas antileptospiros, efetuando-se diluições seriadas em escala geométrica de razão dois em solução salina tamponada de Sorensen e acrescidas de 50 µL do antígeno que reagiu no teste de triagem. As placas foram incubadas em estufa a 28-30°C por três horas e as leituras realizadas em microscópio de campo escuro, no aumento de 100 vezes, observando-se a formação de aglutinação. O sorovar mais provável foi o que apresentou maior título.

Quando um animal apresentou título mais elevado idêntico para dois ou mais sorovares o mesmo foi descartado desta análise⁵⁵.

A técnica de Isolamento de leptospiras para o controle de infecção renal em meio de cultivo de Fletcher foi realizada no Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública da Universidade de Santo Amaro. Após a colheita as amostras de urina foram diluídas (1:10) individualmente em solução salina tamponada de Sorensen e filtradas com auxílio de um micro-filtro estéril para seringa com membrana de 0,22 µm a fim de promover a redução de bactérias contaminantes presentes na urina. Quinhentos microlitros por diluição foram semeados em tubos com tampa de baquelite contendo 4,5 mL de meio semissólido de Fletcher sem antibiótico⁵⁵, dois tubos por diluição, os quais foram incubados em estufa a 28-30°C por seis semanas, com observações semanais⁵⁶ para a verificação da formação do anel de crescimento subsuperficial (Zona de Dinger) de leptospiras no meio⁵⁵, o qual foi confirmado pela constatação efetiva de leptospiras em microscopia de campo escuro.

Para a amplificação do DNA bacteriano das amostras de urina foram utilizados dois pares de *primers* descritos por Mérien et al.⁵⁷, Lep1 (5'GGCGGCGCGTCTTAAACATG-3') e Lep2 (5'-TCCCCCATTGAGCAAGATT-3') que amplificam uma região de 330pb do gene 16S rDNA.

Quadro 1- Relação dos sorovares de leptospiros utilizadas como antígenos na reação de Soroaglutinação Microscópica 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 Utrecht 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 |
| | Pamana | Pamana | CZ 214K |
| | Pomona | Pomona | Pomona |
| | | Pomona | GR6 |
| | Sejroe | Hardjo | Hardjoprajitno |
| | | Wolffi | 3705 |
| | Pyrogenes | Pyrogenes | Salinem |
| | Shermani | Shermani | LT 821 |
| Tarassovi | Tarassovi | Perepelicin | |
| <i>L. biflexa</i> | Andamana | Andamana | CH 11 |
| | Seramanga | Patoc | Patoc - 1 |

4 RESULTADOS

Das 150 amostras de soro canina analisadas, 24 (16%) foram sororreagentes pela técnica de SAM aplicada ao diagnóstico da leptospirose, para qualquer sorovar do 24 testados com títulos variando de 100 a 6.400. Durante a prova de SAM, ocorreram casos de coaglutinação, ou seja, mais de uma variante sorológica apresentou titulações empatadas para uma mesma amostra de soro, o que pode ser indicativo de reação cruzada.

Das 24 amostras sororreagentes, 5 (20,8%) apresentaram coaglutinações com títulos máximos idênticos e estes foram descartados, pois não foi possível determinar o sorovar mais provável. Ocorreram coaglutinações com Canicola e Cynopteri (1:800); Copenhageni e Pomona de referência (1:800); Butembo, Pomona de referência e Pomona (GR6) estirpe autóctone (1:200); Copenhageni e Icterohaemorrhagiae (1:1.600); Pomona de referência e Pomona (GR6) estirpe autóctone (1:200).

Das 150 amostras examinadas, descontando as reações de coaglutinação, foram aproveitadas 19 amostras, as quais identificaram o sorovar Butembo como mais provável em 10 amostras (41,6%), seguidos pelos sorovares Pomona 4 (16,6%), Icterohaemorrhagiae e Copenhageni empatados com 2 (8,33%) e Grippotyphosa com 1 (4,16%). Os sorovares detectados, com suas respectivas titulações são apresentados na Tabela 5.

A distribuição do número de cães e a soropositividade para a leptospirose, segundo as variáveis estudadas no levantamento feito com base no questionário epidemiológico aplicado ao responsável pelo cão são apresentadas na Tabela 6.

Tabela 5- Resultado de amostra de soro de cães submetidos à prova de soroaglutinação microscópica para leptospirose, segundo sorovar mais prevalente, sem a presença de coaglutinações na titulação máxima, São Paulo, 2016.

| SOROVAR | Título de Anticorpos | | | | | | N° de amostras reagentes | % |
|---------------------|----------------------|-----|-----|-----|------|------|--------------------------|--------|
| | 100 | 200 | 400 | 800 | 1600 | 6400 | | |
| Butembo | 1 | 3 | 3 | 2 | 1 | - | 10 | 41,6 |
| Grippotyphosa | - | 1 | - | - | - | - | 1 | 4,16 |
| Copenhageni | 1 | - | - | - | - | 1 | 2 | 8,33 |
| Icterohaemorrhagiae | 1 | 1 | - | - | - | - | 2 | 8,33 |
| Pomona (GR6) | 2 | 1 | - | 1 | - | - | 4 | 16,6 |
| TOTAL | 6 | 6 | 3 | 3 | 1 | 1 | 20 | 79,02% |

*Não constam na tabela a ocorrência de empate na titulação máxima.

Tabela 6- Soropositividade dos animais estudados segundo as variáveis aplicadas do questionário epidemiológico

| VARIÁVEIS | CATEGORIA | Nº DE CÃES | Nº DE AMOSTRAS |
|----------------------------|-----------|------------|----------------|
| | | AMOSTRADOS | REAGENTES |
| Sexo | Macho | 59 | 11 (18,6%) |
| | Fêmea | 61 | 13 (14,2%) |
| Vacinação | Não | 42 | 3 (7,14%) |
| | Sim | 108 | 21 (17,4%) |
| Contato com área alagada | Não | 142 | 0 |
| | Sim | 8 | 8 (100%) |
| Acesso à rua | Não | 47 | 8 (9,19%) |
| | Sim | 103 | 16 (15,5%) |
| Presença de rio | Não | 110 | 17 (19,5%) |
| | Sim | 40 | 7 (17,5%) |
| Terreno baldio próximo | Não | 114 | 20 (17,5%) |
| | Sim | 36 | 4 (11,1%) |
| Região de mata próxima | Não | 90 | 19 (21,1%) |
| | Sim | 60 | 5 (8,3%) |
| Esgoto a céu aberto | Não | 135 | 22 (16,2%) |
| | Sim | 15 | 2 (13,3%) |
| Presença de ratos | Não | 41 | 8 (19,5%) |
| | Sim | 109 | 16 (14,7%) |
| Hábito de caça | Não | 58 | 10 (17,2%) |
| | Sim | 92 | 14 (15,2%) |
| No. de cães no domicílio | Até 3 | 139 | 24 (100%) |
| | > 3 | 11 | 0 |
| Contato com outros cães | Não | 68 | 11 (16,1%) |
| | Sim | 82 | 13 (15,8%) |
| Potes recolhidos a noite | Não | 103 | 16 (15,5%) |
| | Sim | 47 | 8 (17,0%) |
| Contato com outros animais | Não | 97 | 20 (20,6%) |
| | Sim | 53 | 4 (7,5%) |

Não houve crescimento de leptospiros nas 49 amostras de urina colhidas destinadas ao isolamento das *Leptospiras* spp. com finalidade de avaliar a leptospirúria, após o período de observação do cultivo de seis semanas. Essas mesmas 49 amostras também foram negativas quando submetidas a técnica de PCR, a fim de também avaliar a leptospirúria por meio da presença do DNA bacteriano na urina.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou a ocorrência de anticorpos antileptospiras em cães clinicamente saudáveis da zona Sul do município de São Paulo, demonstrando que a leptospirose é uma doença comum e provavelmente subestimada nesta população devido a grande quantidade de animais assintomáticos.

A prevalência obtida foi de 16% nos cães analisados, dados que coincidem com as prevalências de sororreagentes em populações caninas no Brasil, que variam entre 10 e 22%^{58,59,60}. Resultados semelhantes também foram relatados por Lopes et al.⁶¹ (17,9%), mas divergem dos obtidos por Jouglard & Brod⁶² com uma prevalência inferior entre os cães analisados (2,66%), mesmo utilizando como ponto de corte o título igual ou maior a 50. No entanto a prevalência encontrada nesse estudo pode ser considerada baixa, quando comparada as obtidas por Silva-Zacarias⁶³ (25,71%), no Paraná, Aguiar et al.⁶⁴ (27,3%) em Rondônia, e por Lobo et al.⁶⁵ no Rio Grande do Sul nos anos de 2002 (36,4%) e 2003 (56%).

Neste trabalho foi verificada a prevalência dos sorovares Butembo 10 (41,6%) e Pomona (GR6) estirpe autóctone 4 (16,6%). Também foram constatadas reações para os sorovares Icterohaemorrhagiae e Copenhageni ambos com 2 (8,33%) amostras reagentes e Grippotyphosa com apenas uma (4,16%). Resultados diferentes dos trabalhos clássicos de leptospirose canina, os quais relatam como mais prevalentes em cães os sorovares Canicola e Icterohaemorrhagiae. As mudanças observadas nos sorovares tradicionalmente associados aos cães podem ser atribuídas à proteção conferida pelas vacinas antileptospiras, pois a maioria possuem os sorovares Canicola e Icterohaemorrhagiae, quanto a um maior contato entre cães e animais silvestres⁶⁸.

Bichuette⁶⁶ também encontrou uma maior prevalência do sorovar Butembo 5 (22,7%) o que corrobora com os resultados encontrados no presente trabalho. Esse sorovar também foi encontrado por Alves et al.⁶⁷ 7,69% e Querino et al.⁶⁸ que apresentou uma prevalência de 7,5%, porém, ambos em menor frequência. A presença deste sorovar causa preocupação, pois a imunidade desenvolvida contra a leptospirose é sorovar específica e este sorovar não é comumente encontrado na

composição das vacinas comercializadas no Brasil, o que reforça ainda mais a importância da inclusão de novos sorovares na composição das vacinas antileptospirose, bem como na pesquisa de desenvolvimento dessas, visando à elaboração de vacinas mais eficazes e de imunidade mais duradoura.

O sorovar Pomona estirpe GR6, autóctone, com prevalência de 16,6% dentre os animais sororreagentes, foi o segundo sorovar mais frequente, assim como os resultados encontrados por Romero et al.⁷³ em Tolima na Colômbia com 8,2%, porém este resultado foi para a estirpe Pomona de referência (15/182). Neste trabalho ocorreram casos de coaglutinação entre os sorovares Pomona de referência e a estirpe GR6 em duas amostras, resultado indicativo de reação cruzada, porém ressalta-se que estas coaglutinações não foram observadas na maioria das amostras reagentes (22/24). A prevalência de estirpes autóctones em relação a estirpes de referência em inquéritos epidemiológicos tem sido relatada em diversos estudos^{16, 64}. Justifica-se a alta prevalência das estirpes autóctones pelo aumento na sensibilidade e especificidade do teste de SAM, devido à particularidade antigênica entre as estirpes de leptospiros patogênicas. A estirpe GR6 foi isolada do rim de um suíno abatido no município de Suzano, SP, Brasil e tipificada como pertencente ao sorogrupo Pomona sorovar Pomona⁴⁴. A ocorrência deste sorovar sugere proximidades entre populações canina e suína, pois os suínos são considerados hospedeiros de manutenção deste sorovar. De fato, no extremo sul da cidade de São Paulo vários moradores possuem pequenas criações de animais domésticos.

Os sorovares Icterohaemorrhagiae e Copenhageni foram encontrados em 8,33% dos soros caninos examinados, corroborando com dados encontrados por Blazius et al.⁷⁰ que obteve para os sorovares citados uma prevalência de 12,5%. A presença destes sorovares pode estar relacionada ao contato dos cães com roedores sinantrópicos, dentre eles as ratazanas, principal transmissor e reservatório da doença⁶⁸. Ressaltando a necessidade de programas de controle de roedores (desratização) e medidas preventivas vindas de modificações ambientais (antiratização) e educação em saúde.

Embora a infecção causada pelo sorovar Canicola esteja tradicionalmente associada à leptospirose em cães, como as descritas por Fontes et al.⁷¹ e Silva-

Zacarias⁶³, com 54,5% e 33,33% dos cães reagentes, respectivamente, este sorovar não foi detectado no presente trabalho. Esse fato pode ser explicado devido à utilização de vacinas contra a leptospirose nos cães atendidos pelo PROCOPA, visto que segundo questionário aplicado previamente 108 animais haviam sido imunizados contra a leptospirose e apenas 21 desses foram reagentes (17,4%).

Diferentes sorovares tem sido identificados como causadores da leptospirose e Doença de Weil, embora os sorovares Icterohaemorrhagiae, Copenhageni e Canicola sejam os mais prevalentes na SAM em animais suspeitos ou inquéritos sorológicos. Assim descrito por Kalin et al.⁷² que relatou em sua pesquisa três casos de leptospirose em cães suspeitos, que haviam sido infectados pelos sorovares Pomona e Grippotyphosa. Vale ressaltar que os cães do estudo não apresentavam manifestações clínicas de leptospirose e que sugere que estes animais podem acarrear o agente etiológico, servindo de reservatórios da doença para os seres humanos e outras espécies de animais. Segundo Aguiar et al.⁶⁴ o aparecimento de sorovares incomuns para a espécie canina como Butembo, Bratislava, Autumnalis, Cynopteri e Grippotyphosa encontradas neste estudo, pode ser explicado pelo contato com os hospedeiros de manutenção (espécies silvestres ou de outras espécies domésticas) ou compartilhamento de áreas contaminadas com urina desses, o que pode causar infecções acidentais em outras espécies.

A leptospiruria não foi confirmada nas amostras de urina pelos métodos diretos de diagnósticos utilizados no presente trabalho (Isolamento e PCR). O não isolamento em meio de cultura da *Leptospira* spp. mesmo em animais sorologicamente positivos pode ocorrer em animais vacinados recentemente, cujos títulos são indicativos de resposta vacinal e não da infecção ou, ainda quando a infecção se encontra em estágio inicial ou devido a leptospirúria intermitente⁷⁴. Os resultados negativos da PCR podem ocorrer devido à substâncias da própria urina capaz de interferir, como ureia, creatinina e o manejo da amostra, como armazenamento e congelamento⁷⁵.

Através dos dados do questionário epidemiológico aplicado aos responsáveis pelos cães foi possível observar que houve maior porcentagem de machos reagentes do que em fêmeas, dos 24 animais positivos respectivamente 18,6% e 14,2%, a maior ocorrência em machos também foi apresentado por Modolo et al.¹⁴,

Fontes et al.⁷¹ e Alves et al.⁶⁰. Fato que pode ser explicado pelo comportamento territorialista e de acasalamento. Outro fator epidemiológico identificado no presente trabalho foi uma maior positividade em animais que possuem acesso à rua 15,33% (16/103) que pode ser corroborado com Querino et al.⁶⁸ 69,3% (34/49). Todos os animais, os quais o proprietário afirmou que tinham contato com áreas alagadas foram reagentes na soroaaglutinação, dados também constatados por Batista et al.⁷⁶. O contato com enchentes, áreas alagadas são variáveis que podem aumentar a probabilidade de contato dos cães com o agente causador da leptospirose, uma vez que a disseminação do agente é favorecida por épocas chuvosas⁷.

A determinação dos sorovares de leptospiros circulantes na zona Sul do município de São Paulo, além de contribuir para o avanço do conhecimento da cadeia epidemiológica da leptospirose, pode ter implicações no seu diagnóstico, aumentando a sensibilidade da técnica de SAM e auxiliando na identificação de animais infectados, com a inclusão de estirpes autóctones na coleção de antígenos de referência utilizada no diagnóstico. Outra contribuição do conhecimento dos sorovares mais prevalentes é a inclusão dos sorovares patogênicos mais frequentemente encontrados nas vacinas antileptospirose⁷⁷.

6 CONCLUSÃO

Em razão do caráter zoonótico da leptospirose e a grande importância do cão na cadeia epidemiológica da leptospirose urbana fica evidente a importância dos estudos epidemiológicos, uma vez que, os resultados obtidos no presente trabalho permitiram concluir que os cães atendidos pelo PROCOPA estavam expostos a vários sorovares de *Leptospira* spp. Sendo assim, essa zoonose deve ser vista com um pouco mais de atenção, bem como ao controle da população canina e a educação em saúde uma vez que estes animais podem atuar como fonte de infecção tanto para outros animais como para o homem.

REFERÊNCIAS

1. Levett PN: Leptospirosis. Clin Microbiol. Rev. 2001, 14(2):296-326
2. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P: Leptospira and Leptospirosis. 2nd ed. Melbourne, Australia: MediSci; 1999
3. OIE- WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. Manual of diagnostic test an vaccines for terrestrial. Paris, 2008
4. Lehmann JS, Matthias MA, Vinetz JM, Fouts DE. Leptospiral pathogenomics. Pathogens. 2014;3(2):280–308
5. Céspedes M. Leptospirosis: enfermedad zoonótica reemergente. Rev Peru Med Exp Salud Publica 2005; 22(4): 290-307.
6. WORLD HEALTH ORGANIZATION - ILS .Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control.2003, ISBN 9241545895.
7. Langoni, H. Leptospirose: aspectos de saúde animal e saúde pública. Rev. Educ. Contin. 1999, v.2, p.52-58.
8. Figueiredo CM, Mourão AC, Oliveira MA, Alves WR, Ooteman MC, Chamone CB, et al. Leptospirose humana no Município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil: uma abordagem geográfica. Rev Soc Bras Med Trop 2001; 34:331-8.
9. Acha PN, Szyfres B. Leptospirosis. In: Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Vol. I. Bacteriosis y Micosis. 3ª ed. Publicación Científica y Técnica No. 580. Washington; 2003. p 175-186.
10. Monahan, A M, Miller, IS; Nally, JE. Leptospirosis: risks during recreational activities. J of applied microbiol. 2009 107(3), p. 707-716.
11. Ministério da Saúde. Guia de vigilância epidemiológica, 7ª edição. Brasília; 2009. 809p
12. Ministério da Saúde- Portal da Saúde. Sinan/ SVS/MS. Casos confirmados de Leptospirose. Brasil, Grandes regiões e unidades federais. 2000 a 2015 [Acesso em

22 Fevereiro de 2016]. Disponível em: (<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/19/Casos-Confirmados-Lepto-2000-a-2015.pdf>).

13. Ministério da Saúde – Fundação Nacional de Saúde. Leptospirose. Guia de vigilância epidemiológica. Brasília; 2005

14. Tesserolli GL, Alberti JVA, Agottani JVB, Fayzano JVB, Fayzano L, Warth JFG. Soroprevalência para leptospirose em cães de Curitiba, Paraná. *Rev Acad.*, 2005; 3(4):35-8.

15. Modolo J, Langoni H, Shimabukuru F, Mendonça A, Victoria C, Silva W. Investigação soro epidemiológica de leptospirose canina na área territorial urbana de Botucatu, São Paulo, Brasil. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2006;43:598-604.

16. Sarmiento AMC, Guazelli A, Barreto LFG, Costa VMD, Hoffman JL, Lucheis SB, et al. Estudo da leptospirose em cães e gatos, da leishmaniose e da doença de chagas em cães de aldeias indígenas guaranis em parreiros, município de São Paulo-SP. *Vet Zootec.* 2007; 14(2):193-203

17. Benitez A, Rodrigues GG, Gonçalves DD, Burke JC, Alves LA, Müller EE, Freitas JC: Leptospirose em cães errantes encontrados em campus universitário: avaliação sorológica e exame direto da urina. *Semina: Cienc Agr* 2010, 31(1):191–196.

18. Dreer M, Gonçalves D, Caetano I, Gerônimo E, Menegas P, Bergo D, 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*, Botucatu, 2013; 19(23), p. 1-5

19. Paz G, Rocha K, Lima M, Jorge E, Pantoja J, Moraes C et al. Seroprevalence for brucellosis and leptospirosis in dogs from Belém and Castanhal, State of Pará, Brazil. *Acta Amaz.* 2015 Sep; 45(3): 265-270.

20. Johnson, RC, Faine, S; Family II Leptospiraceae . In: N.R.Krieg and J.G.Holt (Ed.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, The Williams and Wilkins Co. 1984; p.62-67

21. Adler B, Chappel RJ, Faine S. The sensitivities of different immunoassays for detecting leptospiral antigen. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A*, 1982; 252(3), 405-413.

22. Musso D , Lascola B. Diagnostic biologique de la leptospirose. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2013(449), 39-46.
23. Adler B. *Leptospira and Leptospirosis*. 1ª Ed. Austrália: Springer, 2015. 295p.
24. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Ações básicas de Saúde Manual de controle da Leptospirose. Ministério da Saúde. Divisão Nacional de Zoonoses- Brasília: Centro de Documentação do Ministério da Saúde, 2002. 543p (Série A: Normas e manuais técnicos).
25. OMS. *Leptospirosis humana guía para el diagnóstico, vigilancia y control* ;2008
26. Greene CE , Syker J E , Brown C A , Hartman K. Leptospirosis. In: GREENE, C.E. *Infectious Diseases of the dog and cat*. 3 ed. St. Louis:Saunders Elsevier, 2006. p. 402-416.
27. Adler B , Monteczuma AP. *Leptospira e leptospirosis*. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, 140,(3-4), p. 287-296, 2010
28. Hagiwara MK. *Leptospirose canina*. *Boletim Técnico*. Pfizer Saude Animal, 2003. p. 1-6
29. Merien F , Truccolo J , Baranton G , Perolat P. Identification of a 36-kDa fibronectin-binding protein expressed by a virulent variant of *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae. *FEMS microbiology letters*, 2000; 185(1), 17-22.
30. *Manual de Leptospirose. Fundação Nacional de Saúde*. 3. ed. Brasília:Gerência Técnica de Editoração; 1997, 2: 7-89.
31. Edwards GA , Domm BM. Human leptospirosis. *Medicine*, 39(1), 1960; 117-156.
32. Wasinski B , Dutkiewicz J. Leptospirosis-current risk factors connected with human activity and the environment. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*,2013; 20,(2).
33. Turner LH.*Leptospirosis II*, *British Medical Journal*,1969; 1:231-235

34. Faine, S. Guidelines for the control of leptospirosis. World Health Organization., Geneva, 1982
35. Wolffenbüttel S, Scheffer J, González FHD, Schmidt V, Oliveira RT. Achados clínico-laboratoriais em sete cães com resposta sorológica à leptospirose. Medvet; 2003.
36. Megid J , Ribeiro MG , Paes AC. Doenças Infecciosas em animais de produção e companhia. *Rio de Janeiro: Roca;* 2016.
37. Loureiro AN , Martins G , Thomé S , Lilenbaum W. Laboratorial diagnosis of animal leptospirosis. Rev Brasileira de Ciên. Vet., Rio de Janeiro. 2013; 20(3), p.119-126.
38. Turner LH. Leptospirosis I, Tropical Medicine and Hygiene, 1967; 61(6): 842-855.
39. Kogika MM , Hagiwara MM , Yasuda PH , Mirandola RMS. Alterações hematológicas na leptospirose canina. Rev da Faculdade de Med. Vet. e Zoot. da Universidade de Sao Paulo, 1987; 24(1), 41-46.
40. Picardeau M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. Médecine et maladies infectieuses, Paris, 2013; 43(1), p. 1-9.
41. Salles RS, Lilenbaum W. Leptospirose bovina no Brasil. Rev. CFMV Suplemento Técnico, 2000; 21 p. 42-46.
42. Ahmad SN, Shah S, Ahmad FM. Laboratory diagnosis of leptospirosis. J Postgrad Med 2005;51:195-20
43. Quinn PJ, Donnelly WJ, Carter ME, Markey BK. Microbiologia veterinária e doenças infecciosas. Porto Alegre: Artmed, 2005.
44. Miraglia F, Moreno AM, Gomes CR, Paixão , Liuson , Morais ZM, et al. Isolation and characterization of *Lepospira interrogans* form pigs slaughtered in São Paulo State, Brazil. Braz. J. Microbiol. 2008; 39:501-507.
45. Sykes JE, Heartmann KFL, Moore GE, Stoddard RA, Goldstein RE. ACVIM Small animal consensus statement on leptospirosis: diagnosis, epidemiology,

treatment and prevention. Journal of Vet. Int. Medicine, Filadélfia, 2011; 25(1), p. 1-13.

46. Fundação Nacional de Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica.. 5ª ed. Brasília: FUNASA; 2002

47. Doenças infecciosas e parasitárias: Guia de Bolso. 6ª edição. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 322p.

48. Vaughan C, Cronin CC, Walsh EK, Whelton M. The Jarisch-Herxheimer reaction in leptospirosis. Postgrad. med. J, 1004; 70: 118-121.

49. 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, 2007; 59(5), p. 1326-1329.

50. Langoni H, Pimentel H, Silva AV, Lucheis , Denardi M. Avaliação da dinâmica de antiorpos pós-vacinais contra *Leptospira* spp, em cães vacinados, pela prova de soroglutinação micorscópica. Ars Vet., 2002; 18:54-61.

51. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Populacional DE 200. Rio de Janeiro: IBGE, 200. 1CD-ROM.

52. Galton MM, Sulzer CR, Santa Rosa CA, Fields MJ. Application of a microtechnique to the agglutination test for leptospiral antibodies. Journal of Applied Microbiology, 1965; 13(1), p. 81-85.

53. Cole JR, Sulzer CR, Pulssely PR. Improved microtechnique for the leptospiralmicroscopic agglutination. Journal of Applied Microbiology, 1973; 5(6), p. 976-980.

54. Alves, CJ. Influência de fatores ambientais sobre a proporção de caprinos sororreagentes para leptospirose em cinco centros de criação do Estado da Paraíba, Brasil. São Paulo [phD. Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP ;1995.

55. Myers MD. Manual de métodos, para el diagnóstico de laboratorio de la leptospirosis. Martinez: OPAS, Centro Panamericano de Zoonosis, 1985.

56. Favero ACM, Mangerona ACS, Alessi LJ, Morais ZM, Pinheiro SR, Ferreira Neto JS, et al. A. Aglutininas pós-vacinais em bovinos imunizados com bacterina tetravalente contra a leptospirose Influência de reações pré-vacinais, homólogas e heterólogas. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, 1997; 64(2), p. 45-55.
57. Merien, F, Amouriauz, P, Perolat, P, Baranton, G, Saint Girons, I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. J Clin Microbiol 30, 1992; 2219–2224.
58. Mascoll R, Pinheiro SR, Vasconcelos AS, Ferreira F, Morais ZM, Pinto CO, et al. Inquérito sorológico para leptospirose em cães do Município de Santana de Parnaíba, São Paulo, utilizando a campanha de vacinação anti-rábica do ano de 1999. Arq Inst Biol, 2002; 69:25-32.
59. Vasconcellos SA. Leptospirose em animais domésticos e silvestres – prevenção e controle. In: Oficina estado da arte e prioridades para P & D em Leptospirose/ Fio Cruz , 2000, Salvador, Resumos. p.18
60. Alves CJ , Andrade J, Vasconcellos S, Morais Z, Azevedo S, Santos F. Avaliação dos níveis de aglutininas anti-leptospira em cães no município de Patos – PB, Brasil. Rev. Bras. Ciênc. Vet. jan./abr. 2000, 7,(1,) p.17- 21.
61. Lopes ALS, Silva WB, Padovani CR, Langoni H, Modolo JR. Frequência sorológica antileptospírica em cães: sua correlação com roedores e fatores ambientais, em área territorial urbana. Arq Inst Biol 2005; 72:289-296.
62. Jouglard S, Brod C. Leptospirose em cães: prevalência e fatores de risco no meio rural do Município de Pelotas, RS. Arq Inst Biol, 2000; 67:181-5.
63. Silva Zacarias F, Marques D, Cardoso M, Freiras J, Zacarias Junior A, Zamarian T. Frequência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual do Norte do Paraná – UENP. Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR, Umuarama, abr./jun. 2014.17(2), p. 91-95.
64. Aguiar D, Cavalcante G, Marvulo M, Silva J, Pinter , Vasconcellos S, et al. 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(1), p 70-76, 2007.

65. Lobo E, Tautz S, Charlier C, Conceição A, Neto J. Estudo comparativo do padrão sorológico de animais domésticos potencialmente transmissores de leptospirose no Município de Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, entre os anos de 2002 e 2003. Caderno de Pesquisa- Série Biologia, 2004; 16 (2), p.47-64.
66. Bichuette, M A. Fatores predisponentes à ocorrência de leptospirose e leishmaniose em cães no Distrito de Córrego Rico, Jaboticabal-SP, 2013.
67. Alves C, Clementino , Oliveira A, Freitas T, Vasconcellos S, Morais Z. Avaliação dos níveis de aglutininas antileptospira em cães de caça na Paraíba, Brasil. Revista Brasileira de Ciência Veterinária, 2004; 11(1-2).
68. Querino A, Delbem A, Oliveira R. Fatores de risco associados à leptospirose em cães do município de Londrina-RO. Semina, 2003; 24(27-34).
69. Greene, CE. Leptospirosis. In: Green CE. Infectious disease of the dog and the cat. 4. ed. St Louis: Elsevier Saunders, 2012.
70. Blazius R, Romão P, Blazius E, Silva. Ocorrência de cães errantes soropositivos para *Leptospira* spp. na cidade de Itapema, Santa Catarina, Brasil. Cadernos de Saúde Pública, 2005; 21(6), p. 1952-1956.
71. Fontes A, Rufino C, Assunção T, Silva J, Belarmino D, Santos D, et al. Soroprevalência de leptospirose em cães no município de Andradina/SP. Ciência Agrária e Saúde, Andradina, 2013; 9(1), p. 21-25.
72. Kalin M, Devaux C, Difruscia R, Lemay S, Higgings . Three cases of canine leptospirosis in Quebec. Can Vet J 1999; 40, p. 187-191.
73. Romero P, Sánchez V, Hayek L. Romero, P.M., Sánchez, V.J. and Hayek, L. Prevalencia de anticuerpos contra *Leptospira* en población urbana humana y canina del Departamento del Tolima, Revista de Salud Pública, 2010; 12, p268–275.
74. Shimabukuro F, Domingues P, Langoni H. Searching of swine leptospiral carrier by microbial isolation and polymerase chain reaction in kidney samples from serologically positive and negative animals. Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science, 2003; 40(4), p.243-253.

75. Boom R, Sol C, Salimans M. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. J. Clin. Microbiol., 1990; 28(3), p.495-503.

76. Batista C, Alves C, Azevedo S, Vasconcellos A, Morais Z, Clementino I. Soroprevalência e fatores de risco para a leptospirose em cães de Campina Grande, Paraíba. Arq Bras Med Vet Zootec., 2005; 57:179-185

77. Araújo, VEM; Moreira, EC; Naveda, LAB; Silva, JA; Contreras, RL. Frequência de aglutininas anti-*Leptospira interrogans* em soros sanguíneos de bovinos, em Minas Gerais, de 1980 a 2002. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2005, 57(4): 430-435,

APÊNDICE A

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Pesquisadores responsáveis: Amane Gonçalves, 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 atendidos no Programa de Controle Populacional Animal (PROCOPA), 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___/15 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? (_____) | Sim () Não () |
| 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? _____ | Sim () Não () |