

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

Soroprevalência e fatores de risco para leptospirose canina no médio sertão paraibano

Inês Maria Barbosa Nunes Queiroga

2009



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

Soroprevalência e fatores de risco para leptospirose em cães do médio sertão paraibano

Inês Maria Barbosa Nunes Queiroga

Graduando

Prof. Dr. Sérgio Santos Azevedo

Orientador

Patos

Agosto de 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

INÊS MARIA BARBOSA NUNES QUEIROGA

Graduando

**Monografia submetida ao Curso de Medicina Veterinária como requisito parcial
para obtenção do grau de Médica Veterinária.**

ENTREGUE EM...../...../.....

MÉDIA:_____

BANCA EXAMINADORA

Professor Dr. Sérgio Santos Azevedo
(Orientador)

Prof. Dra. Márcia Melo
(Examinadora)

Prof. Dr. Edísio Oliveira
(Examinador)

DEDICATÓRIA

- ✓ Dedico esta vitória aos meus pais Edvaldo Nunes da Silva Filho e Francieides Barbosa Martins Nunes, que sempre estiveram ao meu lado, me ensinando a ser uma pessoa de caráter e honesta, são minha fortaleza e meu porto seguro, exemplo de força e determinação, a quem tanto amo e me orgulho.

- ✓ Aos meus irmãos Edvaldo Nunes da Silva Terceiro e Lizandra Karol Barbosa Nunes, por me incentivarem, sempre acreditarem em mim, pela nossa infância, amizade e companheirismo.

- ✓ A minha madrinha e tia Francinez Barbosa Martins, amiga e conselheira, a quem tanto estimo e me orgulho.

- ✓ Ao meu esposo João José Sales Queiroga pelo amor e dedicação em todos esses anos. A você, meu amor, meu coração.

- ✓ Aos meus avós maternos, Inez e Francisco Martins, onde quer que estejam sei que estão orgulhosos.

- ✓ Aos meus avós paternos Edvaldo e Maria, sorrisos que me dão força para seguir.

São eles os meus companheiros de jornada, fonte permanente de estímulo...

AGRADECIMENTOS

- ✓ Agradeço ao poderoso Pai Celestial por trilhar meu caminho e me fazer permanecer nele, me dando a oportunidade de seguir os passos do meu tão amado pai e me tornar Médica Veterinária.
- ✓ Ao meu pai por se preocupar em me dar um futuro digno.
- ✓ A minha mãe por ser maravilhosa e perfeita todos os dias.
- ✓ A todos da minha família primos, tios, cunhados, que sempre acreditaram na minha vitória.
- ✓ Aos professores da Universidade Federal de Campina Grande, pelo carinho e dedicação Dra. Norma, Dra. Márcia, Dra. Sara, Dr. Almir, Dr. Sérgio Ricardo, Dra. Melania e Dr. Olaff, ao Dr. Edísio pelo exemplo de determinação que transmite, que quão atenciosos foram, em especial ao meu orientador Prof. Dr. Sérgio Santos pelos conhecimentos transmitidos contribuindo na minha formação profissional e realização deste trabalho.
- ✓ As minhas amigas Camila (miga), Angélica (tia), Kamila (prima), George, Rodrigo, Ticiano, Syduane, Iana, Cristiane pelo apoio, fraternidade, paciência e presença nos bons e maus momentos do curso e da minha vida.
- ✓ Ao professor Dr. Silvio Arruda Vasconcelos, a Zenaide Maria de Moraes e Amane Paldes Gonçalves da USP, pela enorme contribuição neste trabalho.
- ✓ As amigas Cristiane Melo e Anniele Regina pela ajuda direta e indireta na realização deste trabalho.
- ✓ A Universidade Federal de Campina Grande da qual muito me orgulha de fazer parte.
- ✓ Aos funcionários da UFCG, em especial Tereza, Damião e Dona Francinete pela amizade e cordialidade.

A todos muito obrigado!

SUMÁRIO	PÁG.
RESUMO	07
ABSTRACT	08
LISTA DE TABELAS.....	09
LISTA DE FIGURAS.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
2.REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1. Agente Etiológico.....	13
2.2. Aspectos Epidemiológicos.....	14
2.3. Patogenia.....	19
2.4. Sinais Clínicos.....	21
2.5. Lesões.....	22
2.6. Diagnóstico.....	24
2.6.1. Diagnóstico clínico.....	24
2.6.2. Isolamento.....	25
2.6.3 .Reação Em Cadeia Pela Polimerase.....	25
2.6.4 .Diagnóstico Sorológico.....	26
2.6.5. Exame Direto Em Microscopia De Campo Escuro.....	27
2.6.6. Inoculação em Animais de Laboratório.....	27
2.7 Tratamento.....	28
2.8 Controle e Profilaxia.....	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1 Área de estudo.....	29
3.2 Animais.....	29
3.3 Amostragem.....	29
3.4 Questionário Epidemiológico.....	30
3.5 Colheita de sangue.....	30
3.6Técnica de Soroaglutinação(SAM).....	30

3.6.1 Diluente.....	31
3.6.1.1 Preparo da solução tamponada de Sorensen.....	31
3.6.1.2 Preparo da solução salina tamponada de Sorensen estéril.....	31
3.6.2 Descrição da técnica.....	31
3.6.3 Interpretação.....	31
3.7Análise estatística.....	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5. CONCLUSÃO.....	42
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
7. ANEXOS.....	53

RESUMO

NUNES, INÊS MARIA BARBOSA QUEIROGA. Soroprevalência e fatores de risco para leptospirose em cães do semiárido da Paraíba. Patos, UFCG. 2009 55p. (Monografia - Curso de Medicina Veterinária, Medicina Veterinária preventiva e Saúde Animal).

Investigou-se a prevalência da leptospirose em cães do semiárido da Paraíba e realizou-se um estudo de fatores de risco para a infecção. Foram examinadas 152 amostras de soro sanguíneo de cães, coletados entre os meses de julho e novembro de 2008. O diagnóstico da leptospirose foi realizado pela técnica de soroaglutinação (SAM) utilizando-se uma coleção de 22 sorovares. Para a caracterização do sorovar mais provável, levou-se em conta a titulação e a frequência. A prevalência encontrada foi de 19,73% com maior frequência dos sorovares Autumnalis (13,15%), Grippotyphosa (1,97%), Castellonis (1,32%), e Icterohaemorrhagie (1,32%). A análise de regressão logística multivariada mostrou que os fatores de risco para a leptospirose foram: raça não definida e o contato com caprinos e/ou ovinos.

Palavras-chave: cão, prevalência, leptospirose, fator de risco, sorologia.

ABSTRACT

NUNES, INÊS MARIA BARBOSA QUEIROGA. Seroprevalence and risk factors for leptospirosis in dogs from semiárido of Paraíba. Patos, UFCG. 2009 55p. (Monograph – Veterinary Medicine, Preventive Veterinary and Animal Health)

The prevalence of leptospirosis was investigated in dogs assisted at the Hospital Veterinary from University Federal de Campina Grande Campus Patos city, State of Paraíba, Brazil, and the risk factors for infection were analyzed. Of the 152 samples, 30 were positive, collected from dogs in the period between July and November of 2008. The diagnostic method run for leptospirosis was the microscopic agglutination test, using a batch of 22 leptospiral serovars. The most prevalent serovar was found crossing the results of frequency and titer of agglutinins. The prevalence was 19, 73% and most frequent reactant serovars were Autumnalis (13,15%), Grippotyphosa (1,97%), Castellonis (1,32%), e Icterohaemorrhagie (1,32%). The multivariate logistic regression analysis showed that the risk factors for leptospirosis were: mixed breed and animals that had contact with sheeps and goats.

Keywords: dog, prevalence, leptospirosis, risk factor, serology.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01.	Resultados do teste de Soroaglutinação Microscópica abrangendo os sorovares retores e seus respectivos títulos encontrados nos materiais provenientes dos soros coletados.....	39
Tabela 02.	Análise univariada com a distribuição das variáveis mais associadas à soropositividade para <i>Leptospirose</i> em cães do semi-árido da Paraíba.....	40
Tabela 03.	Fatores de risco associados à soropositividade para <i>Leptospirose</i> determinados por regressão logística múltipla.....	42

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01.** Microscopia eletrônica demonstrando a estrutura de uma *Leptospira*.....14
- Figura 02.** Visualização microscópica de soro aglutinação de *Leptospira* spp.....26

1. INTRODUÇÃO

A urbanização e mudanças sociais da população nas últimas décadas favoreceram o aumento da população canina nos países em desenvolvimento. Segundo ROJAS (1976), as grandes migrações do campo para a cidade, formação de conglomerados marginais urbanos e até mesmo por estes serem de grande valia como companhia, levam ao incremento da população canina. Havendo implicações na saúde pública, pois o animal pode ser responsável pela transmissão de diversas zoonoses, inclusive a leptospirose.

A leptospirose é uma zoonose bacteriana de curso agudo e crônico, de origem endêmica e de caráter sistêmico, sendo uma antropozoonose direta que afeta diversas espécies de animais domésticos, silvestres e os seres humanos, amplamente disseminada, assumindo considerável papel como problema econômico e de saúde pública (FAINE et al., 1999). Os surtos se reproduzem por exposição à água contaminada com urina ou tecidos provenientes de animais infectados (VASCONCELLOS, 1993), particularmente nas ocasiões em que ocorrem elevados índices de precipitações pluviométricas e nas regiões em que o solo apresenta reação neutra ou levemente alcalina, associando-se ainda a variedade de espécies hospedeiras que facilitam a cadeia de eventos necessários para a transmissão da doença.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde a leptospirose está classificada como uma enfermidade de lista B, grupo ao qual pertencem as doenças transmissíveis de grande importância do ponto de vista sócio-econômico e/ou sanitário, cuja repercussão no comércio internacional de animais e produtos de origem animal é considerável (DELBEM et al. 2004).

É uma zoonose de ampla distribuição geográfica, geralmente de caráter ocupacional, representando risco para a saúde pública, especialmente para médicos veterinários, magarefes, agricultores, fazendeiros e tratadores de animais que estão sujeitos ao contato direto como agente e são considerados grupos com maior possibilidade de contrair a infecção, principalmente se essas atividades são executadas na ausência de recursos tecnológicos e de equipamentos de segurança por mão-de-obra desqualificada e mal remunerada (ALMEIDA et al., 1994; FARR, 1995; FAINE et al., 1999; TASSINARI et al., 2004).

No Brasil, durante o período de 1985 a 1997, foram notificados 35.403 casos da doença em humanos, variando de 1.594 casos em 1987 a 5.576 caos em 1997, com 3.821 óbitos registrados (TASSINARI et al., 2004).

Dentre as modalidades de fonte de infecção dos animais acometidos, da maior relevância é o papel dos portadores (convalescentes e sadios), excretores de leptospiras a quem se atribui a maior parcela de culpa pela persistência de focos da doença. Devido à longa duração desta condição e ampla facilidade de deslocamento, por não manifestar sinais de infecção, eles se tornam os reservatórios de manutenção do agente no ambiente (VASCONCELLOS, 1993). Entre os animais domésticos, em nível urbano, a principal fonte de infecção da leptospirose humana são os cães, pois estes animais vivem em contato direto com os seres humanos e podem eliminar leptospiras vivas pela urina durante meses, mesmo sem apresentar nenhum sinal clínico (FAINE, 1999).

Os inquéritos sorológicos exercem um papel de relevância indiscutível no controle da enfermidade, pois permite o conhecimento dos diferentes sorovares existentes em determinada região (FAINE et al., 1999). Além dos resultados sorológicos é importante avaliar os fatores de risco aos quais os cães estão expostos, que justificam sua importância como reservatório e fonte de infecção para o homem.

Tendo em vista a ampliação de informações sobre a enfermidade, e a importância desta doença como zoonose, o objetivo do presente trabalho foi a realização de inquérito sorológico para investigar a sua prevalência fixando-se o período de colheita das amostras de julho a novembro de 2008, e, atentando-se para a determinação dos sorovares mais prováveis bem como identificar fatores de risco associados à infecção.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Agente etiológico

O agente etiológico da leptospirose pertence à ordem Spirochaetales, família Leptospiraceae, gênero *Leptospira*, e se trata de bactérias aeróbias, multiplicação e crescimento lentos, com divisão celular em torno de 7 a 12 horas, móveis, espiraladas, muito finas (0,1 µm diâmetro), de comprimento variando entre 6 a 20µm, extremidades em forma de gancho (figura 1).

Uma cultura em meio líquido leva de 5 a 7 dias para atingir crescimento para ser utilizada como antígeno. São sensíveis à luz solar direta, dessecação, pH ácido, temperaturas inferiores a 7°C ou superiores a 37°C, aos desinfetantes comuns e aos antisépticos, mas sobrevivem bem às condições quentes e úmidas, em pH próximo da neutralidade entre 7,2 e 7,4, em meio a poluição, em terrenos úmidos, pântanos, córregos, lagos e estábulos com excesso de detritos e umidade. O gênero *Leptospira* pode ser liofilizado e é muito sensível aos produtos ácidos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1995).

As espécies (genospecies) de leptospiros são classificadas por homologia do DNA, e, dentro de cada espécie, várias sorovariedades são reconhecidas com base nas reações sorológicas (Faine et al., 1999). Sorovariedades com antígenos em comum pertencem ao mesmo sorogrupo.

Segundo a classificação taxonômica clássica, com base em sorogrupos e sorovares e na patogenicidade, as leptospiros podem ser divididas em dois grandes grupos: patogênicas e saprófitas, onde oito genomoespécies são patogênicas: *L. borgpetersenii*, *L. interrogans* sensu stricto, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. weilii*, *L. kirschneri*, *L. inada* e *L. fainii*, distribuídas em 26 sorogrupos e 250 sorovares; e cinco genomoespécies saprófitas: *L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. wolbachii*, *Turneria parva* e *Leptonema illini* com raros registros de infecções no homem e nos animais.

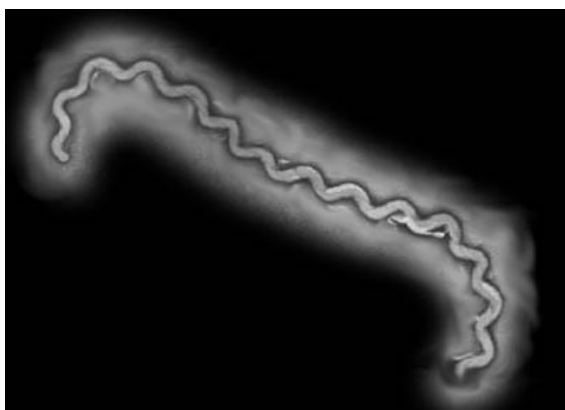


Figura 1. Microscopia eletrônica demonstrando a estrutura de uma leptospira.

Fonte: BATISTA, 2004

2.2.Aspectos epidemiológicos

A leptospirose está mundialmente distribuída e intimamente relacionada ao aumento da população de roedores, já que esses animais são portadores e excretam leptospiros em sua urina, principalmente os da raça *Mus musculus*, *Rattus rattus* e *Rattus norvegicus* que eliminam leptospiros por tempo mais prolongado; e à fatores de risco como densidade populacional do reservatório e ecossistema onde vive o animal, qual a aptidão da raça(guarda, caça, recreação), más condições sanitárias do ambiente onde vive e elevadas precipitações pluviométricas. A água tem papel primordial na transmissão, a principal fonte de transmissão corre pelo contato com água contaminada de rios, lagoas, lagoas e canais, ou oriunda de chuvas fortes e inundações (CORTES, 1993).

Segundo ALVES (1995), houve demonstração da existência de associação entre a proporção de animais soro-reatores para a leptospirose e os índices pluviométricos acumulados. Porém TORTEN (1979), afirma que, embora exista uma tendência de se relacionar às altas precipitações com a ocorrência da doença, esta condição não é necessária para a manutenção do agente e sua transmissão.

A persistência do agente no meio ambiente e o elevado potencial de infecção são assegurados por diversos fatores, tais como: a diversidade de sorovares, a multiplicidade de espécies hospedeiras que podem albergá-los e o relativo grau de sobrevivência no

ambiente sem parasitismo, desde que haja elevado grau de umidade, proteção contra raios solares, temperaturas elevadas (em torno de 20°C) e valores de potencial hidrogeniônico (pH) neutro ou levemente alcalino, em torno de 7,2 a 7,4. Entretanto, as leptospirosas patogênicas não se multiplicam fora do organismo dos hospedeiros (VASCONCELLOS, 1993).

As observações epidemiológicas têm indicado que esses agentes se mantêm circulando na população de hospedeiros primários, usualmente roedores selvagens, a partir dos quais alcançam outras populações de animais sinatropicos e/ou domésticos. Estes são os hospedeiros secundários e acidentais. Neste sentido, a concentração de animais domésticos pode ter como consequência a criação de amplas cadeias infecciosas, que contribuem para a disseminação do agente no meio ambiente e atuam como fator de risco para o homem (CORTES, 1993).

Cada sorotipo de leptospira é adaptado a um determinado animal (hospedeiro de manutenção), podendo este servir como fonte de infecção para animais de outras espécies (RADOSTITS et al., 2002).

A leptospirose acomete, praticamente, todos os animais domésticos, silvestres e o homem, provocando ou não a manifestação de sinais. Animais de muitas espécies domésticas, bem como a maioria das espécies silvestres, podem tornar-se portadores e contribuir para a disseminação do microorganismo na natureza. A eliminação da leptospira pela urina dos portadores ocorre por períodos de tempo que podem variar de poucas semanas a vários meses, entre os animais domésticos, e por toda a vida no caso dos roedores (GIRIO et al., 2004).

Os animais vertebrados agem como reservatórios das leptospirosas, porém os principais são: o rato de esgoto (*Rattus norvegicus*) e o de telhado (*Rattus rattus*). Dentre outros considerados secundários, o cão ocupa posição de destaque, porque além de sofrer a doença, é tido como o mais importante hospedeiro de leptospirosas, após os roedores, pelo contato que mantém com o homem, principalmente nas grandes cidades (YASUDA, 1979).

O modelo de evolução da infecção onde a leptospirose se estabelece após uma fase aguda com sintomatologia evidente caracteriza a modalidade e fonte de infecção referida como “portador convalescente”. No entanto, em surtos de leptospirose em animais de interesse econômico, é comum a existência de indivíduos que apresentam uma fase aguda

assintomática e um período de leptospirúria sem demonstrar a presença de anticorpos. Essa última situação representa a modalidade de fonte de infecção definida como “portador são”, que pela dificuldade em sua identificação, apresenta ainda maior importância em termos de saúde animal e pública (VASCONCELLOS, 1987).

No Brasil, os inquéritos sorológicos já realizados sobre a leptospirose em cães encontraram resultados variáveis, entre 3 a 30%, e os sorovares mais frequentes têm sido *Icterohaemorrhagiae*, *Copenhageni*, *Canicola*, *Pyrogenes*, *Hardjo*, *Castellonis* e *Ballum* (FURTADO et al., 1997; JOUGLARD e BROD, 2000; MASCOLLI et al., 2002; SILVA et al., 2004, MAGALHÃES et al. 2006).

Modolo et al., (2000) na cidade de Botucatu, coletaram 775 amostras obtidas durante a campanha anual de vacinação anti-rábica, destas, 119(15,4%) foram reagentes, sendo os sorovares mais prevalentes: *Canicola* (64,7%), *Pyrogenes* (50,4%), *Icterohaemorrhagiae* (14,3%), *Copenhageni* (14,3%), *Pomona* (4,2%), *Grippythyposa* (1,6%). Encontrou-se diferença significativa em relação à raça – positividade em 17,7% dos animais sem raça definida e em 9,0% dos demais – e sexo – positividade em 18,4% de machos e 11,0% de fêmeas.

Alves et al. (2000) encontraram 20% de reatores em 114 cães da cidade de Patos, PB, com destaque para os sorovares *Autumnalis*, *Butembo*, *Grippythyposa* e *Australis*.

Da Silva et al. (2002), examinando 2.170 amostras de soro canino, procedentes de São Paulo, Rio de Janeiro e Mato Grosso do Sul, obtiveram 29,8% de reagentes, considerando-se títulos ≥ 100 . Os sorovares mais prevalentes foram: *Canicola* (35,6%), *Pyrogenes* (34,7%), *Icterohaemorrhagiae* (28,9%), *Copenhageni* (28,3%), *Autumnalis* (21,5%), *Australis* (9,9%), *Bratislava* (8,7%), *Grippythyposa* (5,1%), *Djasiman* (4,8%), *Hardjo* (4,6%), *Pomona* (4,6%) e *Cynopteri* (1,7%).

Mascolli et al. (2002) realizaram inquérito sorológico para leptospirose com 410 amostras de soro canino provenientes de Santana do Parnaíba – SP, o experimento foi conduzido durante a campanha de vacinação anti-rábica animal de 1999, com a colheita de 410 amostras de soro canino e o preenchimento de um questionário pelos proprietários dos animais, para traçar um perfil epidemiológico da população e proceder à análise estatística dos fatores de risco, onde 15% das amostras foram positivas, com maior frequência dos sorovares *Copenhageni* (24%), *Canicola* (16%) e *Hardjo* (16%).

Lopes et al. (2005) em Botucatu, SP, colheram 1.000 amostras de sangue de cães.

Fez-se sorologia microscópica (SAM), com 24 sorovares de *Leptospira* spp, obtendo-se 17,9% reagentes. Os cães reagentes que tiveram contato com roedores (23,68%) mostraram-se significativos em relação aos reagentes que não tiveram contato (15,37%). Na correlação entre animais de residências ligadas (18,10%) ou não ligadas (13,63%) à rede pública de esgoto e a soropositividade, não se observou significância estatística. Ocorreram reações para 20 sorovares, com maior importância para: castellanis (28,68%), autumnalis (19,12%), pyrogenes (17,65%), icterohaemorrhagiae (11,03%) e canicola (9,56%).

Magalhães et al.(2006), processaram 3417 amostras de soros de cães recolhidos pelo Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte, para cada animal foi preenchida uma ficha com o endereço, e as variáveis: sexo, idade, raça e tipo de apreensão, sendo 828 de cães de busca domiciliar e 2589 de cães de captura. Em 448 (13,1%) foram observadas reações positivas. As maiores frequências de reações positivas foram para as sorovarietades Canicola (7,0%), Ballum (6,1%), Pyrogenes (3,2%) e Icterohaemorrhagiae (2,9%), as demais apresentaram frequência inferior a 1,0%.

Em Campina Grande – PB em 285 amostras de soro, a prevalência encontrada foi de 21,4%, com maior frequência dos sorovares Autumnalis (7,4%), Copenhageni (6%) Canicola (2,1%) (BATISTA et al., 2005).

Brod et al. (2005), isolaram um sorovar patogênico da urina de um cão com leptospirose, utilizando-o para testar amostras de soro de casos de leptospirose humana e canina. Os resultados do teste de SAM indicaram que 100% das amostras de soro humano de 12 pacientes, que haviam reagido com títulos que variaram de 25 a 3.200 para o sorovar canicola, e 72% das amostras de 105 soros caninos, também reagiram.

Aguiar et al., (2007) testaram o soro de 329 cães do município de Monte Negro, RO, dos quais 156 eram da área urbana e 173 da área rural. Foi aplicado um questionário para detectar a existência de possíveis fatores de risco, abordando questões como: idade, sexo, dieta, tipo de criação, ambiente, contato com outras espécies e hábito de caça. 90 (27,3%) amostras foram reagentes sendo 23,7% da área (37/156) urbana e 30,6% (53/173), da área rural. Os sorovares predominantes foram: Autumnalis (22%), Pyrogenes (12%), Canicola (10%) e Shermani (7,5%). Cães acima de 12 meses apresentaram maior

ocorrência de anticorpos quando comparados aos cães mais jovens e dentre os fatores de risco analisados, foram significativos a alimentação e o sexo.

Ghneim et al. (2007) avaliaram 43 casos de animais com diagnóstico de leptospirose, no Norte da Califórnia, onde 17(35,9%) mostraram-se sorologicamente positivos. Utilizou como fatores de risco a raça, o sexo, a idade, ter uma segunda residência, a área territorial por onde o animal transita, ter nadado em riachos ou bebido água, de fonte natural, duas semanas antes do início da doença e ter contato com animais silvestres.

A leptospirose tem distribuição universal. No Brasil, é uma doença endêmica, e, epidêmica em períodos chuvosos, devido às enchentes associadas à aglomeração populacional de baixa renda em condições inadequadas de saneamento e à alta infestação de roedores infectados. No período de 1999 a 2003, foram confirmados 14.334 casos de leptospirose, com números variando entre 2.415 (2003) e 3.532 casos (2001). Nesse mesmo período foram informados 1.683 óbitos, numa média de 336 óbitos/ano. A taxa de letalidade foi de 12%, e 77% foram hospitalizados.

2.3 Patogenia

As leptospiras penetram através de mucosas intactas (ocular, digestiva, respiratória, e genital) ou de lesões, daí ganham a corrente sanguínea iniciando a fase de multiplicação no sangue, e em praticamente todos os órgãos como fígado, baço, rins e até mesmo, no sistema nervoso central e tecidos. É uma doença bifásica com uma fase aguda ou leptospirêmica que pode persistir por até uma semana, ocorrendo febre, depressão, mialgia e inflamação dos túbulos renais, e em seguida uma fase imune, com produção de anticorpos que antagonizam o agente invasor e fazendo com que o mesmo encontre refúgio em áreas como o globo ocular (causando uveíte nos eqüinos) e a luz dos túbulos renais (fase de leptospirúria), onde a imunidade humoral inexistente ou é baixa. Nas fêmeas em gestação, o abortamento e suas complicações tornam a doença importante na esfera reprodutiva, e algumas leptospiras existe uma enzima que causa hemólise intravascular, anemia, icterícia e hemoglobinúria. Em casos de septicemia ocorrem hemorragias em

consequência de lesão endotelial. A transmissão da leptospirose pode ocorrer de forma direta ou indireta. A forma direta ocorre, geralmente, pelo contato com sangue e/ou urina

de animais doentes, por transmissão venérea, placentária ou pela pele (ACHA E SZYFRES, 2001). A transmissão indireta pode ocorrer pela exposição prolongada dos animais susceptíveis à água, ao solo ou pela ingestão de alimentos contaminados. O risco da transmissão indireta aumenta consideravelmente para o homem quando as condições ambientais são favoráveis à manutenção das leptospiros, em especial após enchentes, ou em coleções de água com pouca movimentação, em temperaturas variando entre 0°C e 25°C (GREENE, 1998), principalmente em populações de baixo poder aquisitivo

A maioria das complicações da doença está relacionada à localização da bactéria, e do sorovar envolvido. Na maioria dos casos desenvolve-se de forma branda, dificultando o diagnóstico. As infecções superagudas causam leptospiremia maciça, choque e óbito. As menos graves causam febre, anorexia, vômito, desidratação, polidipsia e relutância ao movimento. Na maioria dos casos, as infecções em cães são crônicas e subclínicas, mas os animais podem apresentar insuficiência renal aguda.

Pode haver complicações que levam à hepatite, processos hemolíticos e hemorrágicos. Observa-se ainda necrose de hepatócitos, colestase intrahepática e diminuição da excreção de bilirrubina com conseqüente icterícia (GENOVEZ, 1996). Também podem instalar-se sem causar nenhuma lesão nos órgãos citados, levando ao estado de portador inaparente ou sadio (GUIMARÃES et al., 1982; VASCONCELLOS, 1987).

A bactéria provoca lesão do endotélio de pequenos e grandes vasos, causando hemorragias e anóxia tissular. Nos demais órgãos determinam hemorragias, principalmente nos pulmões. A morte advém das hemorragias, coagulação vascular disseminada e falência de múltiplos órgãos (GENOVEZ, 1996).

Alguns sorovares da leptospira têm capacidade de produzir hemolisina no período inicial de septicemia, provocando hemólise intravascular intensa, levando à hemoglobinúria. Em casos graves pode ocorrer anóxia anêmica e nefrose hemoglobinúrica (RADOSTITS et al., 2002).

O abortamento é uma seqüela comum após a invasão inicial sistêmica, com ou sem degeneração placentária. A encefalite é mais comum em caprinos e ovinos, enquanto a

mastite pode ocorrer na leptospirose bovina. O período de incubação na leptospirose, usualmente, vai de quatro a dez dias (RADOSTITS et al., 2002).

2.4 Sinais clínicos

Nos cães, os sinais clínicos mais comuns na infecção aguda são: letargia, depressão, anorexia, vômito, febre, poliúria, polidipsia, dor abdominal e/ou lombar, diarreia, mialgia, halitose, úlceras bucais, icterícia, petéquias e sufusões em mucosas e conjuntivas (CORRÊA, 1992; GREENE, 1998; NELSON, 2001).

A infecção pelo sorovar *Icterohaemorrhagiae* pode levar a morte hiper-aguda entre 24 a 48 h. Animais que sobrevivem a esse período podem desenvolver a síndrome ictero-hemorrágica, com sinais de hipertermia, prostração, icterícia, hemorragias difusas - especialmente em pulmões e sistema digestório, podendo evoluir para insuficiência renal aguda e óbito. A infecção pelo sorovar *Canicola* resulta em severo comprometimento renal com sinais de uremia e gastroentéricos (emese, diarreia, estomatite e glossite necrótica), evoluindo geralmente para insuficiência renal crônica (GÍRIO, 1993; NAVARRO, 1982).

Os cães infectados pelos sorovares *Pomona* e *Gryppotyphosa* apresentam, geralmente, anorexia, depressão, vômito, apatia, poliúria, polidipsia e dor lombar. O sorovar *Bataviae* pode causar ainda meningite, uveíte, abortamentos e infertilidade (HARKIN 1996; KALIN 1999; WOHL 1996).

Os animais que desenvolvem insuficiência renal aguda mesmo após o tratamento, podem evoluir tanto para o retorno da função renal normal, em 2 a 3 semanas, como desenvolver insuficiência renal crônica. A icterícia ocorre mais frequentemente na fase aguda da doença, relacionada às infecções pelo sorovar *Icterohaemorrhagiae*. Nessa fase podem ser observadas também fezes de coloração acizentada, em virtude da colestase hepática.

As manifestações pulmonares - como pneumonia intersticial - são mais comuns no homem do que nos cães, e a inflamação intestinal, em alguns animais, pode resultar em intussuscepção (GREENE 1998; HARKIN 1996; KALIN 1999; WOHL 1996).

Em estudo realizado no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina com 120 cães soropositivos para leptospirose, as principais manifestações

clínicas observadas foram: vômito, apatia e diarreia, seguida de sinais menos frequentes como icterícia, estomatite, necrose da ponta da língua e mialgia.

A alta ocorrência de sinais inespecíficos, assim como a reduzida frequência de sinais considerados típicos da leptospirose em cães - necrose da ponta da língua, estomatite e icterícia ressaltam a importância de incluir a leptospirose no diagnóstico diferencial de animais com sintomatologia gastro-entérica inespecífica (vômito, diarreia e anorexia), com ou sem histórico vacinal.

2.5 Lesões

As lesões macroscópicas nos animais e no homem caracterizam-se pela presença de hemorragias petequiais e, menos comumente, equimóticas, espalhadas pelo corpo.

Quando presente a icterícia, a necropsia revela uma intensa coloração amarelo ouro, que atinge todo o organismo. Contrasta, perfeitamente, a cor amarela das inúmeras petéquias espalhadas pelo corpo (ENRIETTI, 2001).

O fígado é o órgão que sofre as maiores modificações de ordem histopatológica. Nele, os microorganismos são encontrados em quantidade grande. Os hepatócitos apresentam-se necróticos ou vacuolizados. Pode ser encontrado em tamanho normal, porém, por vezes, está aumentado, e o seu parênquima está corado de amarelo pela bilirrubina. Muitas vezes, a vesícula biliar é encontrada bastante distendida, acumulando a bile de cor clara ou mesmo sanguinolenta (RIET-CORREA et al. 2001; ENRIETTI, 2001).

O aparelho digestivo também apresenta numerosos pontos de hemorragia no interior da cavidade gastro-entérica. Encontra-se por esse motivo, líquido sanguinolento no estômago e nos intestinos, e a mucosa desses órgãos se apresenta de aspecto hemorrágico puntiforme ou mesmo, com grandes sufusões em toda a sua extensão. Os folículos linfóides do intestino apresentam mobilização evidente com aumento das placas de Peyer, conseqüente à reação histio-linfocitária que se processa. Microscopicamente, as lesões macroscópicas obedecem às mesmas causas que as lesões macroscópicas (ENRIETTI, 2001).

Nos pulmões, as hemorragias são focais e, sempre em torno dos vasos que atravessam o parênquima. O órgão apresenta áreas atelectásicas e sofre hepatização, pois é grande a quantidade de elementos do sangue que são encontrados nos alvéolos. As paredes

dão origem a mobilização dos elementos, que pouco a pouco, invadem o parênquima pulmonar e se transformam em grandes macrófagos que contêm hemácias e pigmentos fagocitados (ENRIETTI, 2001; RIET-CORREA et al., 2001).

O miocárdio aparentemente normal apresenta focos petequiais e hiperemia dos capilares. As petéquias estão situadas no tecido intersticial do miocárdio, principalmente, do lado endocárdico. Torna-se claro o estado de edema em que se encontram as fibras musculares onde estão presentes elementos provenientes do sangue (ENRIETTI, 2001).

Nos rins há degeneração hialina e tumefação das células epiteliais dos túbulos, que apresentam vacúolos de diversos tamanhos ou citoplasma de aspecto granular. Cilindros hialinos, e granulares em menor número são observados em muitos túbulos. Ao lado do processo degenerativo, observa-se lesões hemorrágicas que se localizam nos próprios túbulos, como também, nas próprias alças glomerulares. No timo observam-se numerosas áreas focais hemorrágicas (RIET-CORREA, 2001).

Em síntese, podemos afirmar que as principais modificações patológicas da Leptospirose dependem, em última análise, do grau de icterícia, do índice de azotemia e das modificações acarretadas pelo próprio microorganismo que se localiza nos órgãos após a fase septicêmica. Por esse motivo, as lesões estão representadas por hemorragias em quase todos os órgãos, de preferência nas serosas, tubo gastrointestinal, pulmões, adrenais, rins e, especialmente, músculos voluntários (ENRIETTI, 2001; RIET-CORREA et al., 2001).

2.6 Diagnóstico

2.6.1 Diagnóstico clínico

O diagnóstico da leptospirose canina deve ser embasado nas informações clínico - epidemiológicas, apoiado nos exames laboratoriais subsidiários (BRASIL, 1995). A presença de cães com anorexia, diarreia, vômito, sensibilidade em região abdominal e/ou lombar, com ou sem mucosas e conjuntivas ictéricas, devem levar a suspeita clínica da doença.

A leucopenia pode ser um achado na fase inicial de infecção (leptospirose) evoluindo geralmente para leucocitose com desvio a esquerda, com a progressão da

doença. A trombocitopenia faz-se presente geralmente em cães severamente afetados (GREENE, 1998; HARKIN, 1996).

Exames de função renal revelam freqüentemente aumento dos níveis séricos de uréia e creatinina e variam segundo o grau de comprometimento renal. As alterações das enzimas hepáticas alamina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA), assim como os níveis séricos de bilirrubina, variam com a severidade da lesão hepática. As dosagens de uréia, creatinina, ALT, bilirrubina e FA constituem-se nos principais exames de monitoramento da evolução do quadro clínico e, conseqüentemente, do prognóstico de animais com leptospirose. Na urinálise de cães com leptospirose observa-se geralmente densidade baixa, glicosúria, proteinúria, bilirrubinúria (que normalmente precede a hiperbilirrubinemia), acompanhadas de elevação de cilindros granulosos, leucócitos e eritrócitos no sedimento urinário (GREENE, 1998; HARKIN, 1996; WOHL, 1996).

2.6.2 Isolamento do agente

Alternativamente, pode-se realizar o cultivo microbiológico da urina, do sangue e do líquido céfalo-raquidiano, apesar da dificuldade de isolamento do agente nesses humores orgânicos. Para o isolamento do agente são recomendados os meios seletivos de EMJH (Ellinghausen, McCullough, Johansen, Harris) ou de Fletcher, enriquecidos com antimicrobianos e soro-albumina bovina (BRASIL, 1995).

Alguns cuidados fundamentais devem observados para que haja sucesso no isolamento de *Leptospira* spp. Dentre eles podemos destacar: coleta e utilização de materiais assépticos, rapidez entre a coleta e o processamento da amostra, meios de cultura específicos e convenientes para o isolamento da bactéria, uso de antibióticos seletivos. Os microorganismos contaminantes tornam o isolamento difícil, pois se multiplicam depressa e, por conseguinte, impedem o crescimento de leptospiros (FREITAS et al., 2004).

2.6.3 Reação em Cadeia pela Polimerase

Nos últimos anos, diferentes técnicas inovadoras têm sido empregadas no diagnóstico da leptospirose no homem e em animais, incluindo a hibridização de DNA, restrição de endonucleases e a reação em cadeia pela polimerase - PCR. Essas técnicas apresentam, em comum, elevada sensibilidade e especificidade, e despontam como métodos promissores no diagnóstico da doença, apesar do alto custo.

A detecção do DNA de *Leptospira* spp. pela PCR tem sido de grande utilidade e requer a seleção de *primers* específicos que permitam a amplificação de todas as espécies classificadas como patogênicas ou potencialmente patogênicas, incluindo *L. inadai* e *L. fainei*.

Especificamente a PCR tem vantagens como: rapidez na obtenção dos resultados e sensibilidade e especificidade elevadas. Entretanto, a necessidade de equipamentos especiais, o alto custo dos reagentes e a inexistência de procedimentos automatizados e padronizados são limitações para o seu uso (BATISTA, 2004).

2.6.4 Diagnóstico sorológico

A reação de soroaglutinação microscópica (SAM) é o teste recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para o diagnóstico da Leptospirose. Os anticorpos formados no animal são dirigidos contra o sorovar específico, entretanto, existem reações cruzadas entre diferentes sorovares e, assim, o animal pode ser reagente a vários sorovares simultaneamente, dificultando a identificação do sorovar mais prevalente, responsável pela doença. O estabelecimento do diagnóstico pode ser feito por sorologia pareada, com uma amostra de soro obtida na fase aguda e outra na fase de convalescença. A soroconversão ou uma diferença de quatro diluições entre a primeira a segunda amostra indica infecção aguda. Por exemplo, título 1:100 na fase aguda e 1:800 na fase de convalescença, para o mesmo sorovar. Na prática, por ser difícil a obtenção de amostras pareadas de soro, a sintomatologia e o título de 800 para o sorovar suspeito são altamente sugestivos de leptospirose (HAGIWARA, 2003).

Na bateria de antígenos empregados no teste é incluído pelo menos um representante de cada um dos sorogrupos existentes. Quando nem todos os sorogrupos

estão presentes, a infecção por sorovares do grupo não representado na bateria de antígenos passa despercebida. Nos Estados Unidos da América e no Canadá, a maior parte dos laboratórios das Universidades inclui apenas os sorovares Bratislava, Canicola, Icterohaemorrhagie, Pomona, Hardjo e Grippotyphosa na bateria de antígenos da reação de soroaglutinação microscópica (HAGIWARA, 2003).



Figura 02: Visualização microscópica de soro aglutinação de *Leptospira* spp

Fonte: laboratório de Zoonoses/UNESP, 2008

2.6.5 Exame direto em microscopia de campo escuro

Durante a primeira semana de infecção até os dez dias (fase aguda), especialmente entre três e sete dias, as leptospiros podem ser vistas por exame direto em microscopia de campo escuro, utilizando-se sangue, exsudato peritoneal ou pleural ou a urina. A vantagem da observação direta é a rapidez na obtenção de resultados, entretanto, as desvantagens incluem as dificuldades técnicas para a obtenção de espécimes viáveis, o curto período (três a sete dias pós infecção) em que provavelmente encontra-se um resultado positivo, e a interpretação subjetiva dos resultados, visto que coleções de fibrina e proteína em preparações a fresco podem confundir com leptospiros (FAINE et al., 1999).

Na fase clínica inicial é possível a pesquisa do agente por microscopia de campo escuro, a partir do exame de gota de sangue, até o quarto dia de infecção, ou de urina, entre a primeira e a segunda semana. Esse procedimento apresenta limitações em virtude da intermitência de eliminação das leptospiros na urina (WOHL, 1996), e da pequena sobrevivência do agente no ambiente externo.

2.6.6 Inoculação em animais de laboratório

Leptospiras virulentas causam infecção em animais de laboratório, que podem ser usados para o isolamento primário a partir de materiais clínicos. O hamster (*Mesocricetus auratus*) é a espécie mais sensível à ação das leptospiras, morrendo em aproximadamente quatro dias após a inoculação (ENRIETTI, 2001), sendo, dessa forma, a espécie de eleição para o isolamento de leptospiras (ALVES et al., 1992; OLIVA et al., 1994). A inoculação por via intraperitoneal é a forma mais eficiente para o estabelecimento e evolução de infecções experimentais pelos variados sorovares de leptospiras nestes animais (SAAP et al., 1980; ANDREANI, 1968; BADIOLA et al., 1983; COX & TWIGG, 1981; KRONHAUS et al., 1989; VENUGOPAL & RATNAM, 1990; MACEDO et al., 2004).

2.7 Tratamento

A efetividade da terapia da leptospirose em cães depende do diagnóstico precoce da doença. A instituição da terapia na fase inicial da doença apresenta resultados satisfatórios. O tratamento é baseado na reposição do equilíbrio hidro-eletrolítico e energético, e no uso de antimicrobianos. Nos casos severos de anemia faz-se necessária a realização de transfusão sanguínea (CORREA & CORREA, 1992).

As penicilinas e seus derivados - em especial a ampicilina e a amoxicilina - são os antimicrobianos mais indicados na fase de leptospiremia. Essas drogas são indicadas geralmente na fase inicial da doença, por duas semanas, porém são ineficientes no controle da fase de leptospirúria. Após a terapia na fase de leptospiremia, recomenda-se o uso de antimicrobianos com o intuito de eliminar o estado de animais portadores renais (GREENE, 1998; WOHL, 1996).

Drogas alternativas dos grupos das cefalosporinas, sulfonamidas, fluorquinolonas, macrolídeos, aminoglicosídeos e o cloranfenicol também têm sido utilizadas na terapia da leptospirose canina (GREENE, 1998; HARKIN, 1996).

Embora *Leptospira* spp seja sensível a uma grande variedade de antimicrobianos e a terapia surta efeito quando instituída precocemente, a redução do risco da doença para o homem e para os animais deve ser fundamentada na adoção de procedimentos de controle.

A diidroestreptomicina é a droga de eleição para eliminação do agente dos rins e supressão do estado de portador (GREENE & SHOTTS, 1990). Doxiciclina, na dose de 2,5 a 5 mg/kg, uma vez ao dia, durante duas semanas, também é indicada para a eliminação das leptospiras dos rins (WOHL, 1996).

2.8 Controle e Profilaxia

O controle da leptospirose canina baseia-se na adoção de medidas profiláticas em todos os níveis da cadeia epidemiológica da doença (fontes de infecção, vias de transmissão e susceptíveis). As ações profiláticas relativas às fontes de infecção da leptospirose canina são direcionadas para o saneamento do meio ambiente, visando, principalmente, o controle de roedores. Esses procedimentos incluem o destino adequado do lixo, o uso racional de rodenticidas, a armazenagem adequada de alimentos, além de evitar o acúmulo de entulho em residências e terrenos (BRASIL, 1995).

As vias de transmissão da leptospirose canina são caracterizadas pelo consumo de alimentos e de água contaminada, e/ou o contato por tempo prolongado com água contaminada com a urina de roedores e de outros animais domésticos. A remoção dos restos de água e alimentos dos comedouros dos animais e a eliminação do excesso de água do ambiente - com a canalização de cursos de água e a drenagem de esgotos - são procedimentos determinantes para o controle das vias de transmissão da leptospirose. Os animais suscetíveis constituem-se no último elo da cadeia epidemiológica de transmissão da leptospirose canina. Esse elemento da cadeia de transmissão também é passível da aplicação de procedimentos de controle, mediante a vacinação dos animais.

A vacinação dos animais suscetíveis caracteriza-se como uma das medidas mais efetivas de profilaxia da leptospirose, se adotada simultaneamente aos demais procedimentos de controle da doença em nível das fontes de infecção e vias de transmissão (BRASIL, 1995).

O uso de vacinas comerciais em cães tem sido efetivo em reduzir a prevalência e a severidade da doença (GREENE, 1998; HARKIN, 1996). As vacinas de uso comercial são constituídas usualmente por bacterinas, contendo principalmente os sorovares *canicola* e *icterohaemorrhagiae*, considerados os mais prevalentes na leptospirose canina (CORREA

& CORREA, 1992). Entretanto, essa vacinação não induz proteção cruzada contra outros sorovares importantes na leptospirose em cães.

Diferentes protocolos são descritos para a vacinação de cães contra leptospirose, no entanto, as vacinas comerciais disponíveis para cães têm sido preconizadas, geralmente, a partir de 2 a 3 meses de idade, com no mínimo três reforços - em intervalos de 21 a 30 dias, além da indicação de revacinações semestrais ou anuais. Paralelamente, estudos recentes têm utilizado subunidades do envelope bacteriano para produção de vacinas, assim como investigado diferentes adjuvantes e meios de cultura de *Leptospira* spp., para a produção de novos imunógenos contra a doença (GREENE, 1998).

Diferentes pesquisadores têm assinalado o aumento da ocorrência dos sorovares Pomona, Grippotyphosa, Hardjo e Bratislava, entre outros, na gênese de casos de leptospirose canina (GREENE, 1998; HARKIN, 1996; WOHL, 1996). Esses estudos atestam a importância da pesquisa continuada no desenvolvimento de novas vacinas contra a leptospirose e a necessidade da inclusão de novos sorovares, visando à elaboração de vacinas mais efetivas e de imunidade mais duradoura.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

A pesquisa foi realizada durante o acompanhamento da rotina da Clínica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande na cidade de Patos – PB, cuja área territorial é de 508,7 km² localizada no sertão, região central do trópico semi-árido paraibano, ficando situada a uma altitude de 242 m acima do nível do mar e a uma distância de 289 km da capital do Estado, João Pessoa – PB. Possui clima quente e seco, com temperaturas médias anuais de 35° no verão e 32° no inverno e precipitação pluviométrica anual de aproximadamente 700 mm, em média histórica (PAIVA, 1994; IBGE, 2007; Estação Meteorológica de Patos – PB).

3.2 Animais

Foram utilizados cães atendidos na rotina da Clínica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Campus de Patos, PB.

3.3 Amostragem

Para o cálculo acima foram considerados os seguintes parâmetros: (a) prevalência esperada; (b) erro absoluto; e (c) nível de confiança, de acordo com a fórmula para amostras aleatórias simples (NOORDHUIZEN et al., 1997; THRUSFIELD, 1995):

$$n = \frac{Z^2 \times P(1-P)}{d^2}$$

Onde:

n = número de animais a serem utilizados

Z = valor da distribuição normal para o nível de confiança de 95%

P = prevalência esperada

d = erro absoluto

Utilizando-se uma prevalência estimada em 50% com erro absoluto de 10%, era necessária a amostragem de 96 animais. Por motivo de segurança, foram utilizadas 152 amostras colhidas durante o período de julho a novembro de 2008.

3.4 Questionário Epidemiológico

Os proprietários dos cães responderam a um questionário epidemiológico (Anexo) que foi elaborado de modo a fornecer dados como intuito de verificar a ausência ou presença de algumas práticas e condições que atuem como possíveis fatores de risco para a leptospirose canina. As informações obtidas como os questionários foram inseridas em um formulário eletrônico elaborado com o programa Microsoft Access[®]. Antes da digitalização, todos os questionários foram examinados para verificação de sua integridade.

3.5 Colheita de sangue

A colheita de sangue foi efetuada por punção da veia cefálica utilizando-se escalpes descartável de tamanho 21 ou 23, dependendo do animal, e seringas descartáveis de 10 mL. Excluindo-se apenas animais com menos de seis meses de idade.

As amostras de sangue foram acondicionados em microtubos até a chegada ao Laboratório de Doenças Transmissíveis do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande, coagulação, aonde foram centrifugadas a 3.500

rpm por 10 minutos e estocadas a -20°C para posterior realização do diagnóstico sorológico da infecção por *Leptospira*.

3.6 Técnica da Soroaglutinação Microscópica

Os soros foram examinados através da técnica de soroaglutinação microscópica (GALTON ET al., 1965; COLE et al., 1983), com uma coleção de antígenos vivos que incluiu 24 sorovares de leptospiros: Australis, Bratislava, Autumnalis, Butembo, Castellonis, Bataviae, Canicola, Whitcombi, Cynopteri, Grippotyphosa, Hedomadis, Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Panama, Pomona, Pyrogenes, Hardjo, Shermani, Tassarovi, Andamana, Patoc, Sentoc e Mini. Os sorovares foram utilizados com cinco a oito dias de cultivo no meio de Ellinghausen, Mac Cullough, Johnson, e Harris (EMJH), modificado e enriquecido com soro de coelho, asparagina e cloreto de cálcio e magnésio (ALVES et al., 1996).

As provas laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – VPS/FMVZ/USP.

3.6.1 Diluente

O diluente utilizado na técnica de soroaglutinação microscópica foi representado pela solução salina tamponada de Sorensen estéril (SANTA ROSA, 1970).

3.6.2. Preparo da solução tamponada de Sorensen

A solução foi preparada a partir dos seguintes constituintes: 1,09g de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) E 8,33g de fosfato de sódio bifásico (Na_2HPO_4), os quais foram adicionados em um balão volumétrico contendo 1 litro de água destilada. Logo após foi autoclavado a 120°C por 15 minutos e, logo após, a solução foi colocada num recipiente de vidro âmbar e acondicionada a 4°C .

3.6.3 Preparo da solução salina tamponada de Soensen

A solução foi preparada a partir de 1,840 ml de solução salina fisiológica a 0,85% e 160 ml de solução tamponada de Sorensen, as quais foram adicionadas em um balão volumétrico de 1 litro, logo após autoclavou-se e resfriou-se como descrito anteriormente.

3.6.4 Descrição da técnica da SAM

Inicialmente cada amostra de soro foi diluída na razão de 1:50, ou seja, 0,1 ml de soro diluído em 4,9 ml de solução salina tamponada de Sorensen estéril(SANTA ROSA, 1970). Em seguida, alíquotas de 50 microlitros de cada amostra de soro diluída foram pipetadas para placas de poliestireno com 96 poços de fundo chato.

As misturas de soro e antígeno foram incubadas em temperatura ambiente durante duas horas, tempo necessário para que ocorra a reação antígeno-anticorpo. Ao término do prazo procede-se a leitura em microscópio com condensador de campo escuro e objetiva de longa distância.

Ao final do teste de triagem, foi realizada a titulação dos anticorpos dos soros que se apresentaram positivos por diluições seriadas numa série geométrica de razão dois a partir da diluição 1:50 , em um total de seis diluições. Foi então adicionada, para cada diluição das amostras, 50 µl do antígeno previamente diluído, resultando em diluições de 1:100 até 1: 6.400 por amostra.

3.6.2 Interpretação

Para a caracterização do sorovar mais provável, foi considerado o sorovar que apresentou maior título e o maior número de animais caracterizados como positivos. Caso um animal reagisse para dois ou mais sorovares com o mesmo título, esse animal seria desconsiderado para o cálculo.

O título do soro positivo foi obtido até a diluição que apresentou 50% ou mais de aglutinação no campo de visualização. A amostra de soro que apresentasse título 100 era considerada positiva.

3.7. Análise estatística

Para a análise de fatores de risco, foram formados dois grupos de animais – soropositivos e soronegativos – que, quando comparados entre si quanto às variáveis pesquisadas no questionário epidemiológico, permitiu medir a força da associação dessas variáveis com a presença da leptospirose.

A análise de fatores de risco foi efetuada em duas etapas: análise univariada e análise multivariada. Na análise univariada, as que apresentaram um valor de $p \leq 0,2$ pelo teste de qui-quadrado ou teste exato de Fisher, quando indicado (Zar, 1999), foram selecionadas para a análise multivariada, utilizando-se a regressão logística múltipla (HOSMER e LEMESHOW, 2000), para a definição de um modelo que melhor identificasse os fatores de risco. A colinearidade entre as variáveis preditoras foi verificada por meio da análise de correlação e, para aquelas que apresentaram forte colinearidade (coeficiente de correlação $\geq 0,9$), uma das duas foi excluída da análise múltipla de acordo com a plausibilidade biológica (DOHOO et al., 1996). O nível de significância adotado na análise múltipla foi de 5%. Todas as análises foram realizadas com o programa SPSS 13.0 *for Windows*.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 152 amostras de soros sanguíneos de cães analisadas, constatou-se que 30 (19,73%) apresentaram resultados positivos. Os títulos variaram de 1: 100 a 1:6.400.

As amostras positivas apresentaram reações para uma ou mais variantes sorológicas, predominando as reações para os sorovares Autumnalis (13,15%), Grippotyphosa (1,97%), Castellonis (1,32%), e Icterohaemorrhagiae (1,32%). As menores reações positivas foram observadas para os sorovares Australis(0,66%), Hebdomalis (0,66%) e Butembo (0,6%).

Prevalências superiores foram obtidas por Furtado et al. (1997) e por Ávila et al. (1998), em Pelotas, 28,9% e 34,8%, respectivamente, e ainda Ghein et al. (2007) determinaram 35,9% de prevalência no Norte da Califórnia. No entanto, percentuais inferiores foram encontrados por Jouglaard e Brod (2000), em Pelotas, 2,7%; Mascoll et al. (2002), em Santana de Parnaíba, 15%, Modolo et al. (2000) em Botucatu 15,4% e Magalhães et al. (2006), em Belo Horizonte, 13,1% .

Resultados similares foram obtidos por Lopes et al. (2005) em Botucatu, 17,9% e ainda, Alves et al. (2000) em Patos, e Batista et al. (2004) em Campina Grande - PB, que encontraram prevalências muito próximas às observadas neste trabalho, 20% e 21,4%, respectivamente. Essas diferenças na percentagem de positividade podem ser explicadas pela variedade de fatores que influenciam na ocorrência da leptospirose, com destaque para a topografia, região, temperatura, umidade, precipitação pluviométrica, reservatórios selvagens, reservatórios domésticos e outros fatores ambientais (ALVES et al., 2000), uma vez que as percentagens dos trabalhos desenvolvidos nas cidades de Patos e Campina Grande na Paraíba, mostram-se com resultados similares já que são cidades que apresentam semelhanças regionais e climáticas.

Ainda em similaridade a este estudo tem-se Aguiar et al., (2007), cujo sorovar mais prevalente foi o Autumnalis (22%) e Lopes et al., (2005) , que obteve 19,12% de prevalência para o sorovar Autumnalis que ficou em segundo lugar na pesquisa.

A presença do sorovar Autumnalis causa preocupação, pois não existe imunidade cruzada entre os diferentes sorovares, e no mercado existem as vacinas compostas, basicamente, pelos sorovares Canicola, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa e Pomona, o que reforça ainda mais, a importância da pesquisa continuada no desenvolvimento de

novas vacinas contra a leptospirose e a necessidade da inclusão de novos sorovares, visando à elaboração de vacinas mais efetivas e de imunidade mais duradoura.

A prevalência do sorovar Grippytyphosa aponta a importância da população de roedores na transmissão da doença, visto que os roedores são os hospedeiros de manutenção para esta sorovariabilidade (FAINE et al., 1999), e reforça a necessidade de programas de controle de roedores, adotando, além das medidas ofensivas (desratização), normalmente as únicas utilizadas, a inclusão de modificações ambientais como medidas preventivas e a educação em saúde. Os ratos e, em especial, as ratazanas, tidos como os principais portadores universais das leptospiras, são considerados um dos principais responsáveis pela transmissão da doença ao homem (MASCOLLI et al., 2002).

A ausência de reações para o sorovar Canicola no presente trabalho surpreende, pois este sorovar é citado como o mais encontrado em cães (FAINE et al. 1999). Este achado concorda com Alves et al.(2000), que também realizaram um estudo na cidade de Patos, e, não encontraram animais positivos para o sorovar Canicola. Já em Batista et al.(2004), o sorovar Canicola foi apontado como o terceiro mais prevalente, o que discorda do presente estudo.

Este dado pode ser remetido à eficiência das vacinas utilizadas, visto que apesar de não ter sido selecionado na análise dos fatores de risco, a vacinação ou não dos animais aponta que 47 dos animais atendidos foram vacinados (tabela 2), o que representa 30,92% de todos os animais, apesar do sorovar Icterohaemorrhagie ter apresentado reação positiva (1,32%) esta foi baixa, o que reforça a eficiência das vacinas utilizadas (óctupla, V10), fazendo-se necessário a divulgação insistente da utilização da vacina, nesse contexto, faz-se necessário reforçar a necessidade de inclusão de novos sorovares nas vacinas comerciais.

Observou-se a ocorrência de reações sorológicas para sorovares considerados acidentais para cães, como Australis, Cynopteri e Hebdomadis. Segundo Bolin (1996), em determinadas regiões, diferentes sorovares de leptospiras são prevalentes e são associados a um ou mais hospedeiros de manutenção que servem de reservatórios de infecção, e são geralmente espécies silvestres e, algumas vezes, animais domésticos e de produção, a transmissão entre os mesmos é eficiente, e a incidência da infecção é relativamente alta. O contato com os hospedeiros de manutenção ou áreas contaminadas com urina desses pode causar infecção em outras espécies.

Na análise univariada (tabela 2), as variáveis selecionadas foram a não definição da raça de cada animal, contato com caprinos e/ou ovinos e se o animal foi levado para viajar. A não definição da raça (OR=3,67) e o contato com caprinos e/ou ovinos (OR=10,00) foram apontados como fatores de risco para a infecção por *Leptospira* spp (Tabela 3).

A não definição da raça como fator de risco para a leptospirose também foi citado por WARD et al. (2002), BATISTA et al., (2005) e MODOLO et al., (2000). Animais sem raça definida, geralmente, têm mais acesso à rua, o que aumenta o risco de exposição às leptospiras. Num estudo epidemiológico feito em Buenos Aires, o acesso à rua também foi um fator de risco significativo (RUBEL et al., 1997). Deve-se considerar que este hábito pode propiciar inúmeras possibilidades de infecção pelo contato direto ou indireto com outros animais ou através do acesso às áreas alagadiças. Associado a isso se tem o fato de a maioria dos proprietários terem baixo nível escolar, já que 117 possuem apenas o segundo grau completo, representando 76,97% do total de proprietários significando pouca ou nenhuma informação sobre a doença, meios de transmissão e riscos aos quais os animais podem estar expostos.

O contato com caprinos/ovinos como fator de risco é muito plausível uma vez que a transmissão da doença se dá de forma direta ou indireta. Some-se a isso o fator de que diversos estudos recentes realizados no Brasil apontam para a ocorrência de anticorpos anti-leptospiras em caprinos e ovinos (Lilenbaum et al. (2005), Schmidt et al. (2002), Favero et al. (2002), Araújo Neto et al. (2005), Higino et al. (2007)), bem como o isolamento do agente ou identificação do DNA por PCR (Lilenbaum et al. (2008/2009), Silva et al. (2007), Lilenbaum et al. (2007), Azevedo et al. (2004)). Em determinadas regiões, diferentes sorovares de leptospiras são prevalentes e estão associados a um ou mais hospedeiros de manutenção, ou reservatórios e, esses reservatórios podem ser representados por animais domésticos e silvestres (LINS e LOPES, 1984). O contato com os hospedeiros mantenedores ou áreas contaminadas com a urina destes pode causar infecção em outras espécies.

Estudos conduzidos em caprinos e ovinos no semiárido nordestino apontaram predominância de reações para o sorovar Autumnalis. ARAÚJO NETO et al. (2005) utilizou 100 ovelhas abatidas no matadouro público de Patos - PB para o isolamento da bactéria a partir do trato genital, realizando paralelamente a sorologia, obtendo 9% de

prevalência para doença, e 44,4% de frequência para o sorovar Autumnalis; HIGINO et al. (2007), realizou a sorologia de 80 ovinos, entre machos e fêmeas, e obteve 7,5% de positividade, com 83,3% de frequência para o sorovar Autumnalis e SILVA et al. (2006), determinaram a soroprevalência da leptospirose em 450 amostras de soros caprinos de 45 rebanhos do Cariri Paraibano, obtendo 13,11% de prevalência para a doença e o sorovar mais prevalentes foi o Autumnalis (74,6%). Esses estudos levantam a hipótese dos caprinos/ovinos como fontes de infecção do sorovar Autumnalis na região e reforçam o risco de exposição ao agente pelo contato com esses animais.

Com relação aos outros parâmetros analisados como fatores de risco, não se confirmou associação estatística com variáveis que normalmente estão relacionadas à ocorrência da doença, como o manejo ao qual é mantido o animal e a presença de roedores, o que pode mascarar os resultados obtidos no trabalho a partir do questionário epidemiológico.

TABELA 01. Resultados do teste de Soroaglutinação Microscópica abrangendo os sorovares reatores e seus respectivos títulos encontrados nos materiais provenientes dos soros coletados.

SOROVAR	TÍTULO							TOTAL(%)
	100	200	400	800	1.600	3.200	6.400	
Autumnalis	3	7	2	2	3	1	2	20(13,15)
Grippotyphosa	0	0	2	0	0	1	0	3(1,97)
Castellonis	0	1	1	0	0	0	0	2(1,32)
Icterohaemorrhagie	2	0	0	0	0	0	0	2(1,32)
Australis	0	0	1	0	0	0	0	1(0,66)
Hebdomalis	0	0	1	0	0	0	0	1(0,66)

TABELA 02. Análise univariada com a distribuição das variáveis mais associadas à soropositividade para *Leptospirose* em cães do semiárido da Paraíba.

Variáveis	Sorologia	Leptospirose	P	Total
	para Negativo(%)	Positivo(%)		
Grau de escolaridade				
Analfabeto	2(100)	0(0)		2
1° grau incompleto	27(75)	9(25)		36
1° grau completo	13(81,3)	3(18,8)		16
2° grau incompleto	19(86,4)	3(13,6)		22
2° grau completo	35(85,4)	6(14,6)		41
3° grau incompleto	9(60)	6(40)		15
3° grau completo	17(85)	3(15)	0,320	20
Sexo				
Macho	67(79,8)	17(20,2)		84
Fêmea	55(80,9)	139(19,1)	1,000	194
Idade				
Até 1 ano	30(83,3)	6(16,7)		36
1 a 2 anos	29(87,9)	4(12,1)		33
2 a 3 anos	20(76,9)	6(23,1)		26
3 anos	20(80)	5(20)		25
4 a 6 anos	17(70,8)	7(29,2)		24
Acima de 6 anos	6(75)	2(25)	0,686	8
Raça				
Indefinida	60(73,2)	22(26,8)		82
Definida	62(86,6)	8(11,4)	0,030*	70
Tipo de criação				
Domiciliar	89(78,8)	24(21,2)		113
Semi-domiciliar	27(90)	3(10)		30
Solto	6(66,7)	3(33,3)	0,222	9
Alimentação				
Ração comercial	29(82,9)	6(17,1)		35
Preparação caseira	14(77,8)	4(22,2)		18
Restos de comida	28(80)	7(20)		35
Ração comercial+comida caseira	22(91,7)	2(8,3)		24
Ração comercial+restos	27(75)	9(25)		36
Comida caseira+restos	2(50)	2(50)	0,400	4
Contato com cães				
Sim	65(77,4)	19(22,6)		84
Não	57(83,8)	11(16,2)	0,431	68

Contato com bovinos				
Sim	1(50)	1(50)		2
Não	121(80,7)	29(19,3)	0,357	150
Contato com eqüídeos				
Sim	121(80,7)	29(19,3)		150
Não	22(75,9)	1(50)	0,357	23
Contato com gatos				
Sim	22(75,9)	7(24,1)		29
Não	100(81,3)	23(18,7)	0,687	123
Contato com caprinos/ovinos				
Sim	2(50)	2(50)		4
Não	120(81,3)	28(18,9)	0,175*	148
Contato com silvestres				
Sim	9(75)	3(25)		12
Não	113(80,7)	27(19,3)	0,705	140
Ambiente onde vive o animal				
Terra	36(78,3)	10(21,7)		46
Cimento	55(80,9)	13(19,1)		68
Terra/cimento	31(81,6)	7(18,4)	0,916	38
Limpeza do local				
Sim	115(80,4)	28(19,6)		143
Não	7(77,8)	2(22,2)	1,000	9
Frequência da limpeza				
Diária	81(79,4)	21(20,6)		102
Semanal	26(78,8)	7(21,2)		33
Quinzenal	7(100)	0(0)		7
Mensal	1(100)	0(0)	0,558	1
Vacinado				
Não	22(75,9)	7(24,1)		29
Anti-rábica	64(84,2)	12(15,8)		76
Anti-rábica+óctupla	27(79,4)	7(20,6)		34
Anti-rábica+ V10	2(50)	2(50)		4
Óctupla	7(77,8)	2(20,2)	0,483	9
Passeio com animal				
Sim	82(78,8)	22(21,2)		104
Não	40(83,3)	8(16,7)	0,669	48
Viagem com animal				
Sim	23(92)	2(8)		25
Não	99(78)	28(22)	0,167*	127
Presença de roedores				
Sim	54(81,8)	12(18,2)		66
Não	68(79,1)	18(20,9)	0,829	86
Contato com açudes				
Sim	20(74,1)	7(25,9)		27
Não	102(81,6)	23(18,4)	0,532	125

* Variáveis selecionadas para a regressão logística múltipla ($p < 0,2$)

TABELA 03. Fatores de risco associados à soropositividade para *Leptospirose* em cães determinados por regressão logística múltipla

Fator de risco	<i>Odds ratio</i>	IC 95%	p
Raça não definida	3,67	1,39 – 9,68	0,009
Contato com caprinos/ovinos	10,00	1,19 – 84,32	0,034

3. CONCLUSÃO

A população canina de Patos está exposta a vários sorovares de *Leptospira* spp, com maiores preocupações em cães sem raça definida e provenientes de áreas com contato com caprinos e/ou ovinos. Dando uma maior atenção à necessidade de elaboração de programas com divulgações mais eficientes, que possam atingir comunidades mais carentes em informações e conhecimentos, direcionando essas informações para importância em saúde pública os riscos aos quais não só os animais mas também a população em geral, especificamente as baixa renda, estão expostos, estimulando a educação em saneamento ambiental, e o incremento de pesquisas para inclusão de outros sorovares nas vacinas utilizadas comercialmente.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales**. 3º ed Washington:Organización Panamericana de La Salud, 2001. v. 2. 425p.

ANDREANI, E. leptosirosi da sierotio hardjo. Prove di infeione sperimentale in animale di laboratório. **Zooprofilassi** , v.23, p.557-569, 1968.

AGUIAR, D.M.; CAVALCANTE, G.T.; MARVULO, M.F.V. Fatores de risco associados à ocorrência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em cães do município de Monte Negro, Rondônia, Amazônia Ocidental Brasileira. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.59, p. 70- 76, 2007.

ALMEIDA, L.P.; MARTINS, L.F.S.; Levantamento Soroepidemiológico de leptospirose em trabalhadores do serviço ambiental em localidade urbana da Região Sul do Brasil. Ver. **Saúde pública**, v.28, n.1, p.76-81, 1994.

ALVES, C. J.; VASCONCELLOS, S. A.; CAMARGO, C. R. A.. MORAIS, Z. M.. Influência dos fatores ambientais sobre a proporção de caprinos soro-reatores para a leptospirose em cinco centros de criação do Estado da Paraíba, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.63, n.2, p.11-18, 1996.

ALVES, C. J.; VASCONCELLOS, S. A.; CAMARGO, C. R. A.. MORAIS, Z. M.; MACEDO, N.A.; NUMBERGUER JÚNIOR R.; PINHEIRO, S.R.; FERREIRA NETO, J.S. Influência da estimulação inespecífica com o BCG sobre a susceptibilidade do hamster à infecção por *Leptospira interrogans* sorotipo *pomona*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.29, n.2, p. 193-199, 1992.

ALVES C.J.; ANDRADE, J.S.L.; VASCONCELLOS, S.A.; MORAIS, Z.M.; AZEVEDO, S.S.; SANTOS, F.A. Avaliação dos níveis de aglutininas anti-leptospira em cães no município de Patos-PB, Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.7, n.2, p.17-21, 2000.

ARAÚJO NETO, J.O. **Isolamento de leptospira spp. A partir do trato genital de ovelhas abatidas no matadouro público de Patos-PB, estado da Paraíba, Brasil.** 2005. 58f. Monografia (para obtenção do grau de Médico Veterinário) – Universidade Federal de Campina Grande, patos – PB.

AZEVEDO, S.S. DE, C.J. ALVES, J.S.L. DE ANDRADE, F.A. DOS SANTOS, T.D. FREITAS, C. DE S.A. BATISTA. Isolation of *leptospira* spp. From kidneys of sheep at slaughter. **Scientific Communication**, 2004.

AVILA, M. O.; FURTADO, L. R. I. ; TEIXEIRA, M. M.; ROSADO, R.. L. I.; MARTINS, L. F. S. ; BROD, C. S. Aglutininas anti-leptospíricas em cães na área de influência do Centro de Controle de Zoonoses, Pelotas, RS, Brasil, 1995. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.28, n.1, p.107-110, 1998.

BADIOLA, J.; THIERMANN, A.B.; CHEVILLE, N.F. Pathology features of leptospirosis in hamsters caused by *L. interrogans* serovars *hardjo* and *szwajizak*. *American Journal of Veterinary Research*, v.44, p. 91-99, 1983.

BATISTA, C.S.A. et al. Soroprevalência e fatores de risco para a leptospirose em cães de Campina Grande, Paraíba. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.57, supl.2, p.179-185, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos. **Manual de leptospirose**. 2.ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1995. 98p.

BROD, C. S., ALEIXO, J. A., JOUGLARD, S. D., FERNANDES, C. P. H., TEIXEIRA, J. L. and DELLAGOSTIN, O. A.. Evidence of dog as a reservoir for human leptospirosis: a serovar isolation, molecular characterization and its use in a serological survey. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2005, 38, p. 294-300.

BOLIN CA. Diagnosis of Leptospirosis: A re-emerging disease of companion animals. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery Small Animal** 11: 166-171, 1996.

COLE, J. R.; SULZER C. R.; PURSEL, A. R. Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test. **Applied Microbiology**, v.25, n.6, p.976-980, 1983.

CÔRTEZ, J. A. Aspectos epidemiológicos e ecológicos da Leptospirose. In: **ANAIS DO ENCONTRO NACIONAL EM LEPTOSPIROSE**. Rio de Janeiro, 1993. P. 53-57.

CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.N.M. **Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos**. 2.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1992. p.233-240.

COX, P.J.; TWIGG, G.I. Observations in kidney damage in hamsters following a non-icterohaemorrhagic form of disease resulting from infection by *Leptospira interrogans* serotype *icterohaemorrhagiae*. **Journal of Comparative Pathology**, v.91, p.153-157, 1981.

DA SILVA, A.V.; LIMA, V.Y.; PEZERICO, S.B. et al. **Estudo retrospectivo (1996-2001) dos exames sorológicos para leptospirose humana, ovina, suína, caprina e bovina, realizados no Serviço de Diagnóstico de Zoonoses/FMVZ/UNESP/Botucatu**. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., v.35, supl. 1, p.146, 2002.

DELBEM, A.C.B.; FREIRE, R.L.; SILVA, C.A. fatores de risco associados a soropositividade para leptospirose em matrizes suínas. **Cienc. Rural**, vol.34, p.847-852, 2004.

DOHOO, I.R.; DUCROT, C.; FOURICHON, C.; DONALD, A.; HURNIK, D. An overview of techniques for dealing with large numbers of independent variables in epidemiologic studies. *Preventive Veterinary Medicine*, v.29, p.221-239, 1996.

ENRIETTI, M, A. Contribuição Ao Conhecimento Da Incidência De Leptospiras Em Murídeos, Caninos, Suínos no Paraná. **Braz. Arch. Boil. Technol**, vol. jubilee, p.311-342, 2001.

FAINE S, ADLER B, BOLIN C, PEROLAT P. *Leptospira and leptospirosis*. 2nd edition. MedSci, Melbourne, Vic Australia, 1999.

FAVERO, A.C.M.; PINHEIRO, S.R.; VASCONCELLOS, S.A.; MORAIS, Z.M.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J.S. Sorovares de leptospiras predominantes em exames sorológicos de bubalinos, ovinos, caprinos, eqüinos, suínos e cães de diversos Estados brasileiros. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 32, n.4, p.613-619, 2002.

FAVERO, A.C.M.; PINHEIRO, S.R.; VASCONCELLOS, S.A. et al. Sorovares de leptospirosas predominantes em exames sorológicos de bubalinos, ovinos, caprinos, eqüinos suínos e cães de diversos estados brasileiros. **Ciênc. Rural**. (Santa Maria), v.32, p.613–619, 2002.

FARR, R.W. Leptospirosis. **Clinical Infectious Disease**, v.21, p. 1-6, 1995.

FURTADO LRI, FEHLBERG MFB, AVILA MO, TEIXEIRA MM, ROSADO RLI, MARTIN LFS, BROD CS. Prevalência e avaliação de fatores de risco à leptospirose canina, no Município de Pelotas, R.S. Arquivos do Instituto Biológico 64: 57-61, 1997.

FREITAS, J.C.; SILVA, F.; OLIVEIRA, R.C. Isolamento de leptospira spp., de cães, bovinos e suínos naturalmente infectados. **Cienc. Rural**, vol.34, n.3, p.853-856, 2004.

FOTO: LABORATÓRIO DE ZOONOSES, **UNESP**, 2008.

GHNEIM, G.S. et al. Use of a case-control study and geographic information systems to determine environmental and demographic risk factors for canine leptospirosis. **Vet. Res.**, v.38, p.37-50, 2007.

GUIMARÃES, M.C.; CORTES, J.; VASCONCELLOS, S.A.; ITO, F.H. Epidemiologia e controle da leptospirose bovina. Importância do portador renal e do seu controle terapêutico. **Comunicações Científicas da Faculdade e Zootecnia da Universidade de São Paulo**. São Paulo: v.6/7, n.1/4, 1982/1983.

GIRIO, R.J.S.; PEREIRA, F.L.G.; MACHIORI FILHO, M. Pesquisa de anti-corpos anti-*Leptospiras* spp. em aniaais silvestres e em estado feral da região de Nheocolândia, Mato Grosso do Sul, Brasil: utilização da técnica de imuno-histoquímica para a detecção do agente. **Cienc. Rural**, vol.34, n.1, p.165-169, 2004.

GREENE, C. E.; SHOTTS, E. B. Leptospire. In : GREENE, C. E. (Ed.) **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1990. P.498-507.

GREENE, C.E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat** . 2.ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1998. p.273-281.

GALTON, M. M. et al. Application of a microtechnique to the agglutination test for leptospiral antibodies. **Applied Microbiology**, v. 13, p. 81-85, 1965.

GENOVEZ, M.E. Leptospirose em cães. **Pet. Vet.** , v.1, n.1, p.6-9, 1996.

GIRIO, R.J.S. Abordagem Clínica da Leptospirose Animal. In: ENCONTRO NACIONAL EM LEPTOSPIROSE, 3, 1993, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro, 1993. p.59.

HAGIWARA, M. K. **Leptospirose canina**. São Paulo: Pfiser Saúde Animal (Boletim Técnico). 2003. 6p.

HARKIN, K. R. Canine Leptospirosis in New Jersey and Michigan: 17 cases (1990-1995). **JAAHA** , v.32, p.495-

HARTMAN, E.G.; VAN HOUTEN, M.; VAN DER DONK, J.A.; Determination of specific anti-leptospiral immunoglobulins M and G in sera of experimentally infected dogs by soliphase enzyme-linked mmunosorbent assay. **Veterinary Immunology and Immunopatology**, v.7, p. 43-51, 1984.

HIGINO, S.S. **Isolamento de leptospira spp. a partir do trato geniturinário de ovinos abatidos no Matadouro Público de Patos, estado da Paraíba, Brasil**. 2007. 44f. Monografia (para a obtenção do grau de Médico Veterinário) – Universidade Federal de Campina Grande, Patos – PB.

HOSMER, D.W.; LEMESHOW, S. Applied logistic regression. New York: John Wiley & Sons, 2000. 375p.

JOUGLARD, S.D.D.; BROD, C.S. Leptospirose em cães: prevalência e fatores de risco no meio rural do município de Pelotas, RS. *Arq. Inst. Biol.*, v.67, p.181-185, 2000.

KALIN, M.D.C.; DIFRUSCIA, R.; HIGGINS, R. Three cases of canine leptospirosis in Quebec. **Can. Vet. J.** , v.40, n.3, p.187-191, 1999.

KRONHAUS, A.E.; BARRIOLA, J.E.; SARAVI, M.A. Aislamento y detección de leptospira interrogans a partir e l medula óssea femoral de hamsters inoculados experimentalmente. **Revista de Medicina Veterinária**, v.70, p.82-88, 1989.

LANGONI, L. Leptospirose: aspectos de saúde animal e de saúde pública. **Revista de Educação Continuada de CRMV-SP**, v.2, n.1, p. 52-58, 1999.

LILENBAUM, W., SOUZA, G.N., RISTOW, P., MOREIRA, M.C., FRAGUAS, S., CARDOSO, V.S., OELEMANN, W.M.R., 2007. serological study on Brucella abortus, caprine arthritis–encephalitis virus and Leptospira in dairy goats in Rio de Janeiro, Brazil. **The Veterinary Journal** 173, 408–412.

LILENBAUM, W., VARGES, R., BRANDÃO, F.Z., CORTEZ, A., SOUZA, S.O., BRANDÃO, P.E., RICHTZENHAIN, L.J., VASCONCELLOS, S.A., 2008. Detection of Leptospira spp. in semen and vaginal fluids of goats and sheep by polymerase chain reaction. **Theriogenology** 69, 837–842.

W. LILENBAUM, R. VARGES, P. RISTOW, A. CORTEZ, S.O. SOUZA , L.J. RICHTZENHAIN , S.A. VASCONCELLOS. Identification of Leptospira spp. carriers among seroreactive goats and sheep by polymerase chain reaction. **Research in Veterinary Science** ,n.87 ,p.16–19, 2009.

LILENBAUM, W.; RODRIGUES, F.; BARBOZA, F. Aglutininas antileptospiras em caninos do município amazônico de Oriximiná-Pará, Brasil. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v.3, p.133-135, 2000.

LINS, Z.C.; LOPES, M.L. Isolation of Leptospirs from wild forest animals in Amazonian Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 78: 124-126, 1984.

LOPES, A. L. S.; SILVA, W. B.; PADOVANI, C. R.; LANGONI, H. et al. (2005). **Freqüência sorológica antic leptospírica em cães: sua correlação com roedores e fatores ambientais, em área territorial urbana.** Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.72, n.3, p.289-296, jul./set., 2005.

MACEDO, N.A.; ALVES, C. J.; VASCONCELLOS, S. A.; CAMARGO, C. R. A.. MORAIS, Z. M.; NUMBERGUER JÚNIOR R.; PINHEIRO, S.R. Influência da via de inoculação sobre o estabelecimento e evolução a Leptospirose em hamsters (Mesocricetus auratus) experimentalmente infectados com Leptospira interrogans sorovar pomona. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.41, n 2, 2004.

MAILLOUX, M. Leptospiroses = Zoonoses. **International Journal of Zoonoses**, v.2, p.45-54, 1985.

MAGALHÃES, D.F.; SILVA J.A.; MOREIRA, E.C. Prevalência de aglutininas anti-*Leptospira interrogans* em cães de Belo Horizonte, Minas Gerais, 2001 a 2002. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.58, p.167-174, 2006.

MASCOLLI, R. 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.*, v.69, p.25-32, 2002.

MERIEN F, AMOURIAUX P, PEROLAT P, BARANTON G, SAINT GIRONS I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology* 30:2219-2224, 1992.

MODOLO, J.R.; LANGONI, H.; SHIMABUKURU, F. et al. Inquérito soroepidemiológico para leptospirose canina no município de Botucatu, SP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA DE CAMPO GRANDE, 26., 1999, Campo Grande. *Anais...* Campo Grande, 2000.

NAVARRO, E.K.; KOCIBA, G. Hemostatic changes in dogs with experimental *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae infection. *Am. J. Vet. Res.* , v.43, n.5, 1982.

NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Medicina Interna de Pequenos Animais** . 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p.1000-1005.

NOORDHUIZEN, J. P. T. M.; FRANKENA, K.; VAN DER HOOF, C. M.; GRAAT, E. A. M. **Application of quantitative methods in veterinary epidemiology**. Wageningen: Wageningen Press, 1997. 445 p.

OLIVA, R.; INFANTE, J.F.; GONZALEZ, M.; PEREZ, V.; SIFONTES, S.; MARRERO, O.; VALDES, Y.; FARIÑAS, M.; ESTEVEZ, L.; GONZALES, I. Pathologic-clinical characterization of Leptospirosis in a Golden Syrian Hamster Model. **Archives of Medical Research**, v.25, n.2, p.165-170, 1994.

PIMENTEL, V.L. **Avaliação da dinâmica de anticorpos aglutinantes antileptospíricos, pós-vacinais, em cães errantes pela prova de soroaglutinação microscópica**. Botucatu, 1999. 95p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Campus de Botucatu.

PAIVA, M. P. M. **Paraíba nossa terra**. São Paulo: Ed. Do Brasil S. A. 191p, 1994.

PRESCOTT J, FERRIER R, NICHOLSON V, JOHNSON K, HOFF B. Is canine leptospirosis under diagnosed in southern Ontario? A case report and serological survey. *Canadian Veterinary Journal* 32:481-486, 1991.

QUINN, P. J. *et al.* **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005, 512p.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. *Clínica Veterinária*. 9. ed. Rio de Janeiro, 2002, p. 874-887.

RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MÉNDEZ, M.C.; LEMOS, R.A.A. **Doenças de ruminantes e equinos**. 2 ed.. São Paulo: Varela, 2001. 426p.

ROJAS, R.A. Algumas zoonosis. In: ROJAS, R. A. **Epidemiologia**. Buenos Aires: Intermédica, 1976. p. 369-384.

RUBEL, D.; SEJO, A.; CERNIGOI, B.; VIALE, A.; WISNIVESKY-COLLI, C. *Leptospira interrogans* en una población canina Del Gran Buenos Aires: variables asociadas com La seropositividad. **Rev. Pan. Salud Public.**, v.2, n.2, p.102- 105, 1997.

SANTA ROSA, C.A.; CASTRO, A.F.P.; CALDAS, A. Isolamento de *L. icterohaemorrhagiae* e *L. hyos* de suínos abatidos em matadouro. **Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo**, v. 29, p.285-292, 1962a

SANTA ROSA, C. A. Diagnóstico laboratorial das leptospiroses. **Revista de Microbiologia**, v.1, n.2, p.97-109, 1970.

SAPP, W.J.; SIDIQUE, I.H.; WILLIAMS, S.S.; GRAHAN, T. Histopathological evaluation of livers of pregnant hamsters infected with *Leptospira canicola*. **American Journal of Veterinary Research**, v.41, p.1283-1292, 1980.

SCHMIDT, V.; AROSIL, A.; SANTOS, A.R. levantamento sorológico da leptospirose em caprinos leiteiros no Rio Grande do Sul, Brasil. **Cienc. Rural**, vol.32, n.4, p.609-612, 2002

SILVA, W.B.; LOPES, A.L.S.; MODOLO, J.R. et al. Freqüência de aglutinina anti-*Leptospira* em cães, de acordo com o manejo de criação, na área urbana de Botucatu-SP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CLÍNICOS DE PEQUENOS ANIMAIS, 25., 2004, Gramado, RS. *Anais....* Gramado: ANCLIVEPA, 2004. p.87.

SILVA E. F., CLAUDIOMAR S. BROD , GUSTAVO M. CERQUEIRA , DE´BORA BOURSCHEIDT , NU´BIA SEYFFERT, ADRIANO QUEIROZ , CLEITON S. SANTOS, ALBERT I. KO , ODIR A. DELLAGOSTIN Isolation of *Leptospira noguchii* from sheep **Veterinary Microbiology**, n. 121 (2007), p.144–149.

TASSINARI, W.S.; PELLEGRINI, D.C.P.; SABROZA, P.C. Distribuição espacial da Leptospirose no município do Rio de Janeiro, Brasil, ao longo dos anos de 1996-1999. **Cad. Saúde pública**, vol.20, no.6, p.1721 – 1729, 2004.

TESSEROLLI, G.L., ALBERTI, J.V.A., BERGAMASCHI, C., FAYZANO, L.; AGOTTANI, J. V.B. Principais sorovares de leptospirose canina em Curitiba, Paraná. **PUBVET**, V.2, N.21, Art.239, Mai4, 2005.

TORTEN, M. Leptospirosis. IN: STEELE, J.H.; STOENNER, H.; KAPLAN, W. **CRC handbook series in zoonosis. Seccion A: Bacterial, rickettsial and micotc diseases.** Boca Raton: CRC Press, 1979, p. 363-421.

THRUSFIELD, M. **Epidemiologia veterinária.** Zaragoza, Acribia, 1990, 339p.

THRUSFIELD, M. **Veterinary epidemiology.** 2. ed. Cambridge: Blackwell Science, 1995. 479 p.

VASCONCELLOS, S.A., O papel dos reservatórios na manutenção de leptospirose na natureza. **Comunicação Científica Da Faculdade De Medicina Veterinária E Zootecnia Da Universidade De São Paulo**, v.11, p.17-24, 1987.

VASCONCELLOS, S.A. Leptospirose animal. In: **III ENCONTRO NACIONAL EM LEPTOSPIROSE, 1993**, Rio de Janeiro, RJ. Ministério da Saúde, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Nacional de Saúde. *Resumos.* p. 62-65.

VENUGOPAL, K.; RATNAM, S. Lesions and immune responses produced in hamsters and guinea pigs inoculated with some strains of leptospira. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.28, p. 1075-1077, 1990.

VIEGAS, S.A.R.A. et al. Investigação sorológica para leptospirose em cães errantes na cidade de Salvador – Bahia. **Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.**, v.2, p.21-30, 2001.

WOHL, J. S. Canine leptospirosis. **Compendium of Continuing Education Practicing Veterinarian**, v.18, n.11, p.1215-1224, 1996.

YASUDA, P.H. - **Leptospirose em cães errantes na cidade de São Paulo**. São Paulo, 1979. [Tese de doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas da USP].

YASUDA, P.H.; SANTA ROSA, C.A.; MYERS, D.M.; YANAGUITA, R.M. The isolation of leptospire from stray dogs in the city of São Paulo, Brazil. *International Journal of Zoonoses*, v.7, p.131-134, 1980.

ZAR, J.H. Biostatistical analysis. 4. ed. **UpperSaddle River: Prentice Hall**, 1999. 663p.

7. ANEXOS

7.1. Questionário epidemiológico utilizado para identificação dos fatores de risco.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
UNIDADE ACADÊMICA DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE PATOS**

Leptospirose em cães do médio sertão paraibano: inquérito sorológico e fatores de risco

QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO

1. DADOS DO PROPRIETÁRIO			
Nome:			
Endereço:			N°:
	Bairro:	CEP:	
	Telefone:		
Grau de escolaridade:	<input type="checkbox"/> Analfabeto <input type="checkbox"/> 1º Grau incompleto <input type="checkbox"/> 1º grau completo <input type="checkbox"/> 2º grau incompleto <input type="checkbox"/> 2º grau completo <input type="checkbox"/> 3º Grau incompleto <input type="checkbox"/> 3º Grau completo		
Já ouviu falar ou sabe o que é Leptospirose Canina? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO			
Porque motivo trouxe o animal?			
2. DADOS DO ANIMAL			
Nome:			
Sexo:	<input type="checkbox"/> Macho <input type="checkbox"/> Fêmea		
Idade :	<input type="checkbox"/> 6 – 12 meses <input type="checkbox"/> 12 – 24 meses <input type="checkbox"/> 24 – 48 meses <input type="checkbox"/> 4 – 6 anos <input type="checkbox"/> acima de 6 anos		
Raça:	<input type="checkbox"/> Sem raça definida <input type="checkbox"/> Com raça definida <div style="text-align: right;">Qual?</div>		
Já sofreu casos de abortamento? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO			
Nos partos aconteceram casos de natimortos? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO			
3. MANEJO			
Tipo de criação:	<input type="checkbox"/> Domiciliar <input type="checkbox"/> Semi-domiciliar <input type="checkbox"/> Solto		

Alimentação :	<input type="checkbox"/> Ração comercial <input type="checkbox"/> Alimento preparado em casa <input type="checkbox"/> Restos de comida		
Tem contato com outros animais?	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO	
Se tem, quais são?	<input type="checkbox"/> Cães	<input type="checkbox"/> Bovinos	<input type="checkbox"/> Equídeos
	<input type="checkbox"/> Gatos	<input type="checkbox"/> Caprinos/ovinos	<input type="checkbox"/> Suínos
Qual o ambiente onde o animal é criado?	<input type="checkbox"/> terra <input type="checkbox"/> cimento <input type="checkbox"/> terra/cimento		
É realizada limpeza ou desinfecção do local?	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO	
Com que frequência?	<input type="checkbox"/> Diária <input type="checkbox"/> Semanal <input type="checkbox"/> Quinzenal <input type="checkbox"/> Mensal		
O animal tomou alguma vacina?	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO	
Se sim, quais?			
Costuma passear com o animal?	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO	
Quando viaja, leva-o junto?	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO	
Há quanto tempo viajou?	Local:		
4. OUTRAS INFORMAÇÕES			
Ocasionalmente, há ratos em sua residência?	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO	
O animal tem contato com açudes?	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO	

OBRIGADO!