UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS DA LEPTOSPIROSE CANINA NO MUNICÍPIO DE UBERLÂNDIA, MG

Jacqueline Ribeiro de Castro
Médica Veterinária

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL
Abril de 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS DA LEPTOSPIROSE CANINA NO MUNICÍPIO DE UBERLÂNDIA, MG

Jacqueline Ribeiro de Castro

Orientadora: Profª. Dra. Anna Monteiro Correia Lima-Ribeiro

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – UFU, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias (Saúde animal - Clínica Médica e Investigação Etiológica)

UBERLÂNDIA – MG

Abril de 2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

C355a Castro, Jacqueline Ribeiro de, 1983-
Aspectos epidemiológicos e imunológicos da leptospirose

canina no município de Uberlândia, MG [manuscrito] /

Jacqueline Ribeiro de Castro. - 2010.

87 f. : il.

Orientadora:.Anna Monteiro Correia Lima-Ribeiro.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Inclui bibliografia.
1. Leptospirose em animais - Teses. 2. Leptospirose em animais - Epidemiologia - Teses. 3. Leptospirose em animais - Aspectos imuno-lógicos - Teses. 4. Cão - Doenças - Teses. I. Lima-Ribeiro, Anna Mon-teiro Correia. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 619:616.986.7

Elaborado pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de Catalogação e Classificação

EPÍGRAFE

"Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim".

Chico Xavier

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, minhas irmãs e sobrinhas
Joana Darc e Luis Antônio
Letícia e Priscila
Maria Eduarda e Melissa
Ao meu eterno amor da minha vida
Hugo Henrique
Pelo constante auxílio e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Aos técnicos do Laboratório de Doenças Infecctocontagiosas,
Marília, Manoel e Altair, os quais propiciaram a execução deste sonho.

A minha orientadora
Prof. Dra. Anna Monteiro Correia Lima-Ribeiro
Pelo apoio, auxílio e oportunidade em todos os momentos, minha eterna gratidão. Pela amizade concedida de forma incondicional e por ter me ensinado que basta acreditar e lutar que tudo é possível.

Ao médico Veterinário **Rone Cardoso**
Pelo auxílio, incentivo e credibilidade concedida a esta pesquisa.

A bióloga **Fabiana A. A. Santos**
Pela paciência e amor dedicado à ciência.

A todos da **Prefeitura Municipal de Uberlândia** e ao **Centro de Controle de Zoonoses** que gentilmente nos receberam e forneceram dados essenciais.

Ao **Prof. Dr. Ednaldo Carvalho Guimarães**
Pela contribuição direta e por tornar a ciência exata mais prazerosa.

A **Jandra Pacheco dos Santos (UNIUBE) e Assis (UNESP- Jaboticabal)** pela compreensão e fornecimento de sorovares nos momentos difíceis.

As minhas amigas médicas veterinárias **Mariana Assunção Souza, Sandra Renata Sampaio Salaberry e Renata Lima de Miranda**, as quais dedicaram, sofreram e lutaram ao meu lado.

As mestrandas **Tatiane Cristina Fernandes Tavares** e **Pollyanna Mafra Soares** que me ajudaram finalizar a parte experimental.

Aos **cãezinhos** e **proprietários** que me receberam em festa e valorizaram a pesquisa, em busca da saúde animal e humana.

Aos demais amigos, família e colaboradores,

A todos vocês, meu eterno agradecimento.

SUMÁRIO

Página

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS..... 01

CAPÍTULO 2 – OCORRÊNCIA E FATORES DE RISCO DA LEPTOSPIROSE CANINA NO MUNICÍPIO DE UBERLÂNDIA, MG
Resumo 11
Introdução 13
Material e métodos 15
Resultados e Discussão..... 18
Conclusão 30
Referências 31

CAPÍTULO 3 – LEPTOSPIROSE CANINA RELACIONADA A SAZONALIDADE NO MUNICÍPIO DE UBERLÂNDIA, MG
Resumo 35
Introdução 37
Material e métodos 39
Resultados e Discussão 42
Conclusão 48
Referências 49

CAPÍTULO 4 – CINÉTICA DA RESPOSTA IMUME HUMORAL DE CÃES JOVENS IMUNIZADOS CONTRA *Leptospira interrogans*
Resumo 54
Introdução 56
Material e métodos 60
Resultados e Discussão 64
Conclusão 73
Referências 74

CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 80

LISTA DE ABREVIATURAS

CEUA – Comitê de Ética na Utilização de Animais na Universidade Federal de Uberlândia

CCZ – Centro de Controle de Zoonoses

EMJH –Ellinghausen-McCulloug-Jonson-Harris (Meio líquido de cultivo para *Leptospira* spp.)

IgA – Imunoglobulina da classe A

IgM – Imunoglobulina da classe M

IgG – Imunoglobulina da classe G

ILS – Subcomitê Internacional de Leptospirose

LPS – Lipoporisacárideo (lipoproteínas de membrana externa)

OMC - Outer Membrane Complex (complexo de membrana externa)

PMU – Prefeitura Municipal de Uberlândia

SAM – Exame de Soroagluitinação Microscópica

SRD – sem raça definida

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Frequência de sorovares em 268 amostras de soro de cães reagentes domiciliados em Uberlândia, MG, 2008 18

Tabela 2: Coaglutinação de diferentes sorovares de *Leptospira* spp. em cães domiciliados no município de Uberlândia, MG, 2008 19

Tabela 3: Cães reagentes contra *Leptospira* spp. de acordo com variáveis analisadas no inquérito epidemiológico como possíveis fatores de risco na ocorrência da leptospirose canina, no município de Uberlândia, MG, 2008.....21

Tabela 4: Notificações de roedores de acordo com os distritos sanitários de Uberlândia, MG, durante o ano de 2008.....25

Tabela 5: Casos de Leptospirose humana em Uberlândia, MG, classificados conforme ano de notificação 26

Tabela 6: Resultados da SAM* de Leptospirose humana realizados no Laboratório de Doenças Infeccontagiosas da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, MG, no período de 2007 a 2009.....26

Tabela 7: Resultados da SAM* de Leptospirose humana realizados em Laboratórios particulares do município de Uberlândia, MG, no período de 2007 a 2009.....27

CAPÍTULO 3

Tabela 1: Dados referentes ao microclima do município de Uberlândia, MG, 2008.....40

Tabela 2: Frequência dos principais sorovares de *Leptospira* spp. presentes na população canina reagente de Uberlândia, MG, 2008 42

CAPÍTULO 4

Tabela 1: Proporção de cães vacinados reagentes à *Leptospira* spp. sorovares Canicola, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae e Pomona, independente da colheita, de acordo com os fatores de risco analisados no inquérito epidemiológico, no município de Uberlândia, MG, 2009.....72

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

Figura 1: Zonas urbanas do município de Uberlândia, MG, Brasil, 2008.....16

Figura 2: Frequências de cães reagentes contra *Leptospira* spp. de acordo com a localização no distrito sanitário do município de Uberlândia, MG, 2008.....23

Figura 3: Representação gráfica da distribuição dos 76 cães sororeagentes a *Leptospira* spp. de acordo com os bairros e zonas do município que coabitam, durante a campanha da raiva, Uberlândia, MG, 2008 29

CAPÍTULO 4

Figura 1: Esquema do protocolo vacinal e de colheita de sangue executado na presente pesquisa.....61

Figura 2: Médias dos logaritmos dos títulos de anticorpos detectados pela SAM para diferentes sorovares, em cães filhotes do Grupo A (com raça definida) vacinados contra *Leptospira interrogans* sorovares Canicola, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa e Pomona.....65

Figura 3: Médias dos logaritmos dos títulos de anticorpos detectados pela SAM para diferentes sorovares, em cães filhotes do Grupo B (sem raça definida) vacinados contra *Leptospira interrogans* sorovares Canicola, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa e Pomona.....65

Figura 4: Frequência de filhotes (n=26) com títulos de anticorpos > 1:100 detectados na SAM contra *Leptospira interrogans* por sorovares não contidos na vacina.....68

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS DA LEPTOSPIROSE CANINA NO MUNICÍPIO DE UBERLÂNDIA, MG

RESUMO – Objetivou-se verificar a ocorrência da leptospirose em cães e os principais fatores de riscos relacionados à doença no município de Uberlândia, Minas Gerais, e analisar a cinética da resposta imune humoral de cães jovens com e sem raça definida contra *Leptospira interrogans*. Todas as amostras deste experimento foram submetidas ao exame de Soroglutinação Microscópica (SAM). Para identificação dos cães reagentes contra *Leptospira* spp. foram examinadas 268 amostras de soro sanguíneo de cães de diferentes distritos sanitários do município e detectada uma ocorrência de 28,36% (76/268) de cães reagentes aos sorovares Autumnalis (34,21%), Tarassovi (23,58%), Canicola (17,11%) e Grippotyphosa (14,47%). Os machos foram mais acometidos a Leptospirose quando comparados às fêmeas e o distrito sanitário Leste apresentou um maior número de cães reagentes. Avaliou-se também a relação da frequência de cães sororeagentes a *Leptospira* spp. com as variáveis climáticas do município, para isto, foram examinadas 150 amostras, sendo 75 coletadas no período seco (Junho à Novembro) e 75 no período chuvoso do ano (Dezembro à Maio). Verificou-se uma frequência de 38%, com o predomínio do sorovar Autumnalis (15,79%). Notou-se uma diferença significativa ($p<0,05$) na ocorrência da leptospirose nos cães, com maior frequência de cães sororeagentes no período chuvoso. A resposta imune humoral contra *Leptospira interrogans* foi analisada em 26 cães jovens, sendo 17 de raça definida (Grupo A) e nove sem raça (Grupo B), após três imunizações com uma bacterina comercial contra os sorovares Canicola, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae e Pomona. Não houve diferença estatística entre os títulos de anticorpos aglutinantes entre os Grupos A e B ($p>0,05$), exceto na colheita II ($p<0,05$), na qual o grupo B apresentou títulos para o sorovar Autumnalis. Após avaliação da resposta vacinal dos cães frente uma bacterina comercial anti-*Leptospira*, a presente pesquisa alerta para os riscos de infecção que os cães vacinados anualmente estão submetidos.

Palavras-chave: Cães, *Leptospira interrogans*, sazonalidade, vacinação.

EPIDEMIOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL ASPECTS OF CANINE LEPTOSPIROSIS IN UBERLÂNDIA COUNTY, MG

ABSTRACT – The aim of this study was to verify the occurrence of leptospirosis in dogs and the main risk factors related to disease in the city of Uberlandia, Minas Gerais, and analyze the humoral immune response of young dogs with and without defined race against *Leptospira interrogans*. All samples were subjected to this research Microscopic Agglutination Test (MAT). To determine the prevalence of anti-*Leptospira* spp. agglutinins were examined 268 samples of blood serum of apparently healthy dogs from different districts in the county. Was detected 28.36% (76/268) of dogs reagents to serovars Autumnalis (34.21%), Tarassovi (23.58%), Canicola (17.11%) and Grippotyphosa (14.47%). Males were more likely to leptospirosis compared to females. The district east had a greater number of dogs reagents. We also evaluated the relationship between the frequency of dogs reactive serum *Leptospira* spp. with climatic variables in the municipality, for this, 150 samples were examined, 75 were collected during the dry season (June to November) and 75 in the rainy season (December to May). It was determined a frequency of 38%, with the predominance of serovar Autumnalis (15.79%). We noticed a significant difference ($p < 0.05$) in the occurrence of leptospirosis in dogs, more frequently positive from dogs in the rainy season. The humoral immune response against *Leptospira interrogans* was analyzed in 26 young dogs, and 17 mixed breed (Group A) and nine mixed breed (Group B) after three immunizations with a commercial vaccine against serovars Canicola, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae and Pomona. There was no statistical difference between the agglutinating titers between Groups A and B ($p > 0.05$), except the harvest II ($p < 0.05$), in which the group B titers to serovar Autumnalis. To assess the efficiency of vaccine culture anti-Leptospira this research to warn the rich infection that dogs are vaccinated annually submitted.

Key words: Dogs, *Leptospira interrogans*, seasonality, vaccination.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial que acomete os animais domésticos, silvestres e o ser humano. Quando presente em animais de produção gera perdas econômicas significativas, com alta morbidade, sendo uma doença de importante repercussão na saúde pública (BATISTA et al., 2004). Suas implicações em saúde pública, perdas produtivas e reprodutivas justificam o uso da vacina como medida profilática.

Os cães (*Canis familiares*) e o rato de esgoto (*Rattus novergicus*) são os principais reservatórios da leptospira no ambiente urbano, sendo importantes na transmissão da doença para a espécie humana (RIBEIRO et al., 2003). Favero et al. (2002) destacaram a participação de roedores sinantrópicos como fonte comum de infecção ao cão e a espécie humana.

O cão no meio urbano é fonte potencial na transmissão da doença devido ao estreito convívio com ser humano, favorecendo desta forma a transmissão da doença. De acordo com Vasconcellos (2005), a infecção está altamente difundida nas populações caninas e uma parcela dos cães acometidos comporta-se como portador o que contribui para a persistência e propagação dos focos da zoonose.

Segundo Magalhães et al. (2006), a doença é comumente encontrada em áreas próximas as favelas, pois geralmente nestes locais o saneamento básico é precário possibilitando uma maior exposição das populações humana e canina com os roedores. Caracteriza-se por ser uma doença sócio-econômica que acomete principalmente indivíduos em precárias condições de habitação. Ocorre em proporções aceleradas principalmente nas áreas urbanas, devido o crescimento caótico de favelas, déficit estrutural e, sobretudo a carência de uma política educacional.

A incidência da Leptospirose humana em países da América Latina eleva-se associada ao crescimento desordenado das cidades e desastres naturais. No Brasil ocorreram cerca de 9.447 casos registrados da doença entre os anos de 2003 e 2005 (OLIVEIRA et al., 2009).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2003) a prevalência da doença na população humana é estimada em um caso para cada cem mil

indivíduos, sendo que este índice eleva-se para dez a cem indivíduos acometidos nesta razão, nas regiões de clima tropical como o Brasil, onde a doença é endêmica. Já na população canina, o número de casos aumenta de forma gradativa acompanhada por alterações na dinâmica da ocorrência dos sorovares predominantes.

O agente etiológico da leptospirose é uma bactéria que compõe a ordem Espirochaetales, família Leptospiraceae e o gênero Leptospira. As bactérias desta família possuem forma espiralada ou helicoidal, apresentam endoflagelos e motilidade, com extremidade na forma de gancho. Constituem este gênero espécies patogênicas e não patogênicas (saprófitas). Estes microrganismos são exigentes e requerem meios especializados para seu cultivo em laboratório (QUINN et al., 2005).

A taxonomia do gênero *Leptospira* constitui assunto de grande confusão. Tradicionalmente, o gênero foi agrupado levando-se em consideração as características sorológicas; duas espécies eram reconhecidas; *Leptospira interrogans* contendo patógenos e *Leptospira biflexa* contendo saprófitos. As espécies de leptospira são agora classificadas por homologia do DNA e, dentro de cada espécie, vários sorovares são reconhecidos com base nas reações sorológicas. Sorovariedades com antígenos em comum pertencem ao mesmo sorogrupo. São conhecidas mais de 250 sorovares distribuídos em 23 sorogrupos (LEVETT, 2001, ADLER; DE LA PENÃ MOCTEZUMA, 2009). Os principais sorogrupos e seus respectivos sorovares da *Leptospira interrogans* encontram-se descritos no ANEXO 3.

A nomenclatura adotada na presente pesquisa foi de acordo com as recomendações da Sociedade Internacional de Leptospirose (ILS)[1] integrada ao Comitê Internacional de Nomenclatura Bacteriana.

As leptospiras sobrevivem no ambiente em condições favoráveis de pH (7,0-7,4), temperatura (28-30°C) e umidade, por apresentarem membrana citoplasmática e parede celular envolta por uma membrana externa com dupla camada composta de proteínas, fosfolipídeos e lipopolissacarídeos (LPS) na camada externa, que em condições desfavoráveis de pH, temperatura e em ambientes secos resultam em uma desorganização deste envelope, com consequente destruição do agente no

[1]ILS -International Leptospirosis Society
Disponível em: <http://www.med.monash.edu.au/microbiology/staff/adler/ils.html>

meio ambiente. O LPS é também denominado endotoxina, um potente estimulados das respostas imunológicas (FAINE et al., 1999).

Períodos com elevados índices de precipitações pluviométricas e regiões em que o solo apresente-se neutro ou levemente alcalino, associado a uma variedade de espécies hospedeiras que facilitem a cadeia de transmissão do patógeno pode resultar em surtos epidêmicos devido a maior exposição à água contaminada com urina ou tecidos provenientes de animais infectados (LEVETT, 2001).

A infecção do hospedeiro geralmente ocorre por meio do contato com leptospiras no ambiente por meio de água e alimento contaminados com urina, fômites ou carcaça de animais infectados. Pode ainda ocorrer a transmissão do agente por via transplacentária e venérea. Geralmente as leptospiras estão presentes nos túbulos renais dos mamíferos doentes/portadores conhecidos como hospedeiros de manutenção. Considera-se o cão como hospedeiro de manutenção do sorovar Canicola (BOLIN, 2000).

Após penetrarem mucosas, pele lesada ou íntegra em condições que favoreçam a dilatação dos poros, as leptospiras se multiplicam rapidamente ao ingressarem no espaço vascular sanguíneo caracterizando a fase de leptospiremia e produzem lesões em vários órgãos nos hospedeiros suscetíveis (FAINE et al., 1999).

A inflamação inicial provocada pela espiroqueta causa injúria renal e hepática. A recuperação da infecção dependerá da produção elevada de anticorpos específicos frente o sorovar infectante. A manutenção do patógeno no epitélio tubular renal caracteriza a fase de leptospiúria em que o agente infeccioso é eliminado na urina do hospedeiro de manutenção de forma intermitente por período que pode se prolongar por anos (ETTINGER; FELDMAN, 2004).

A leptospirose nos cães se apresenta com variado polimorfismo clínico. Os sinais clínicos dependem da idade e imunidade do hospedeiro, dos fatores ambientais que afetam os microrganismos, da virulência do sorovar infectante e do sistema afetado (ETTINGER; FELDMAN, 2004).

Apresenta-se de forma aguda, subaguda e crônica. Nas infecções agudas pode ocorrer disfunção da coagulação e levar a coagulação intravascular disseminada e a leptospiremia maciça pode resultar em choque e óbito. Nas

infecções menos graves causam febre, anorexia, vômito, desidratação, poliúria, polidpsia, e mialgia. A deterioração da função renal progressiva resulta em oligúria ou anúria. Alguns cães podem apresentar icterícia. A maioria das infecções por leptospira em cães cursa de forma subclínica assintomática a crônica com quadros de insuficiência renal e hepática (ETTINGER; FELDMAN, 2004; GEISEN et. al., 2007).

Geralmente a infecção pelo sorovar Icterohaemorrhagiae pode levar a quadros agudos e óbito nas primeiras 48 horas. Cães que sobrevivem a este período podem desenvolver a Síndrome Ictero-hemorrágica com sinais clínicos de prostração, icterícia e hemorragias difusas afetando principalmente pulmão e sistema gastro-entérico, além das lesões difusas no fígado (LEVETT, 2001).

A infecção pelo sorovar Canicola resulta em comprometimento renal grave com estabelecimento de Síndrome Urêmica, evoluindo geralmente para insuficiência renal crônica. Os sorovares Pomona e Grippotyphosa podem causar anorexia, depressão, vômito, apatia, poliúria, polidpsia e dor lombar apresentando principalmente sinais gastroentéricos (RIBEIRO et al., 2003; MAELE et al., 2008).

O diagnóstico da leptospirose canina deve ser fundamentado nas informações clínico-epidemiológicas e confirmado por exames laboratoriais. Alterações hematológicas como leucocitose, anemia e trombocitopenia podem estar presentes. Quadro de azotemia com elevação da creatinina e uréia pode ser identificado na bioquímica sérica, além da possível elevação das enzimas hepáticas (ETTINGER; FELDMAN, 2004).

Em virtude das dificuldades do isolamento do agente em amostras biológicas os métodos sorológicos têm sido amplamente utilizados no diagnóstico confirmatório da leptospirose. A técnica padronizada e recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e Ministério da Saúde no Brasil (BRASIL, 1995), estabelecida como padrão ouro no diagnóstico da leptospirose humana e animal é a Soroaglutinação Microscópica (SAM) com a utilização de antígenos vivos.

O SAM apresenta elevada especificidade, no entanto, baseia-se na detecção de anticorpos que só estarão presentes sete a dez dias pós infecção. Além disto, ocorre dificuldade na manutenção da bactéria em laboratório por se tratar de um microrganismo que requer meios específicos e enriquecidos, sensível às condições

adversas e baixa competitividade frente a outros microrganismos. Desta forma, outras técnicas de diagnóstico estão sendo adotadas, como a técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) que é extremamente sensível e específico no diagnóstico precoce da leptospirose, embora mais onerosa (TEIXEIRA et al., 2008). Jimenez-Coelho et al. (2008) demonstraram um correlação positiva de 96% entre os resultados da SAM e do ensaio imunoenzimático (ELISA), o qual apresentou boa sensibilidade e especificidade resultando em uma boa alternativa na detecção de anticorpos anti-*Leptospira* em soro de cão.

Mello; Manhoso (2007) avaliaram aspectos epidemiológicos da leptospirose canina no Brasil e concluíram que a doença apresentou índices variáveis de acordo com o estado e região do país. Os autores também pesquisaram os sorovares predominantes, com maior registro para o Canicola e Copenhageni, seguido pelo Icterohaemorrhagiae e Autumnalis. Destacaram ainda, que os índices verificados relacionavam-se com as particularidades de cada região, como fatores climáticos, sazonais e socioeconômicos e recomendaram que sejam realizados novos estudos visando aumentar o número de sorovares contidos nas vacinas contra a leptospirose canina.

As bacterinas anti-*Leptospira* devem ser constituídas pelos sorovares de maior prevalência em cada região, pois a inclusão de sorovares desnecessárias poderá contribuir para a redução de antígenos dos sorovares realmente necessários e aumentar o risco de reações indesejáveis, além de onerar o custo das vacinas para o consumidor final (VASCONCELLOS, 2005).

As vacinas disponíveis atualmente no mercado brasileiro caracterizam-se por serem provenientes de culturas de leptospiras inativadas acrescidas de adjuvantes compostas pelos sorovares mais prevalentes em estudos efetuados no país. Para os cães encontram-se disponíveis vacinas polivalentes como a óctupla composta por dois sorovares (Icterohaemorrhagiae e Canicola), a déctupla com quatro sorovares (Icterohaemorrhagiae, Canicola, Grippotyphosa e Pomona) e a undéctupla com cinco sorovares (acrescido do sorovar Conpenhageni).

Diante da importância do tema foi proposto como objetivo geral avaliar os aspectos epidemiológicos e imunológicos da leptospirose canina no município de Uberlândia, MG. E como objetivos específicos determinar a ocorrência da

leptospirose em cães, os fatores de risco, a relação entre a frequência de cães soreagentes a *Leptospira* spp. com a sazonalidade no município, bem como, investigar os principais sorovares presentes na população canina estudada. Além disto, avaliar a imunidade humoral por meio da cinética de produção de anticorpos anti-*Leptospira interrogans* pós-vacinais em cães jovens de diferentes raças.

REFERÊNCIAS

ADLER, B.; MOCTEZUMA, A.P. *Leptospira* and Leptospirosis. **Veterinary Microbilogy**, Amsterdam, v.140, n.3/4, p.287-296, 2010. Disponível em: <doi:10.1016/j.vetmic.2009.03.012>. Acesso em: 12 jan. 2010.

BATISTA, C.S.A; AZEVEDO, S.S.; ALVES, C.J.; VASCONCELLOS, S.A.; MORAIS, M.; CLEMENTINO, I.J.; LIMA, F.S.; ARAUJO NETO, J.O. Soroprevalência de leptospirose em cães errantes da cidade de Patos, Estado da Paraíba, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 41, n.2, p. 131-136, 2004. Disponível em: < http://www.scielo.br/pdf/bjvras/v41n2/25230.pdf >. Acesso em: 19 out. 2008.

BOLIN, C. **Leptospirosis**. In: Emerging Diseases of Animals. AMS: Washington, 2000, p.185-200.

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

ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. Doenças Bacterianas In: **Tratado de Medicina Interna Veterinária: Doenças do cão e do gato**. 5.ed. Guanaba Koogan: Rio de Janeiro, 2004, p.418-419.

FAINE, S ; ADLER. B.; BOLIN,C.; PEROLAT, P. **Leptospira and leptospirosis**. 2. ed. Melbourne: MedSci, 1999. 272 p.

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

Disponível em: < http://www.scielo.br/pdf/cr/v32n4/a11v32n4.pdf >. Acesso em: 14 jun. 2007.

GEISEN, V.; STENGEL, C.; BREM, S.; MULLER, W.; GREENE, C.; HARTMANN, K. Canine leptospirosis infections- clinical signs and outcome with different suspected *Leptospira* serogroups (42 cases). **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v.48, n.6, p 324-328, 2007. Disponível em: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/117961781>. Acesso em: 19 out. 2008.

JIMENEZ-COELHO, M.; VALDO-SOLIS, I.; CÁRDENAS-MARRUFO, M.; RODRÍGUEZ-BUENFIL, J.C.; ORTEGA-PACHECO, A. Serological survey of canine leptospirosis in the tropics of Yucatan Mexico using two different tests. **Acta Tropica**, Basel, v.106, n.1, p.22-26, 2008. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science>. Acesso em: 14 dez. 2008.

LEVETT, P.N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.14, n.2, p.296-326, 2001. Disponível em: < http://cmr.asm.org/cgi/content/full/14/2/296 >. Acesso em: 14 jul. 2008.

MAELE, I.V.; CLAUS, A.; HAESEBROUCK, F; DAMINET, S. Leptospirosis in dogs: a review with emphasis on clinical aspects. **Veterinary Record**, London, v.163, n.14, p.409-413, 2008. Disponível em: < http://veterinaryrecord.bvapublications.com/cgi/content/163/14/409>. Acesso em: 14 jul. 2009.

MAGALHÃES, D.F.; SILVA, J.A.; MOREIRA, E.C.; WILKE, V.M.L.; HADDAD, J.P.A.; MENESES, J.N.C. Prevalência de aglutininas anti-*Leptospira interrogans* em cães de Belo Horizonte, Minas Gerais, 2001 a 2002. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 2, p. 167-174, 2006. Disponível em: < http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v58n2/29657.pdf >. Acesso em: 15 jan.2008.

MELLO, L.P.P.; MANHOSO, F.F.R. Aspectos epidemiológicos da leptospirose canina no Brasil. **Unimar Ciências**, Marília, v.16, n.1-2, p.27-32, 2007. Disponível em: <http://www.unimar.br/publicacoes/2009/unimar_ciencias_16.pdf>. Acesso em: 16 jan.2008.

OLIVEIRA, D.S.C.; GUIMARÃES, M.J.B.; MEDEIROS, Z. Modelo produtivo para a leptospirose. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v.38, n.1, p. 17-26, 2009. Disponível em: < http://www.revistas.ufg.br/index.php/iptsp/article/view/6205 > Acesso em : 20 out. 2009.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. Espiroquetas. In:_____. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. cap. 31, p. 179-188

RIBEIRO, M.G.; BELONI, S.N.; LANGONI, H.; SILVA, A.V. Leptospirose canina. **Boletim técnico**. Departamento Técnico Fort Dodge Saúde Animal, (S.I., s.n.), 2003. Disponível em: < http://www.duramunemax.com.br/boletins/boletimLepto.pdf>. Acesso em 05 jan. 2008.

TEIXEIRA, M.A.; GONÇALVES, M.L.L.; RIEDIGER, I.N.; PROSSER, C.S; SILVA, S.F.C.; BIESDORF, S.M.; MOSKO, P.R.E.; MORAIS, H.A.; BIONDO, A.W. Sorologia negativa e PCR positiva: a importância da biologia molecular para o diagnóstico de leptospirose aguda em um cão. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v.8, n.73, p. 44-48. 2008.

VASCONCELLOS, S.A. Leptospirose canina no Brasil. Uma abordagem epidemiológica. **Boletim técnico**. Divisão de Saúde Animal, cód. 290.778, p.1-8, 2005. Disponível em: < http://www.pfizersaudeanimal.com.br/PDFs/boletim_set_2005.pdf>. Acesso em: 05 jan. 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION/ INTERNATIONAL LEPTOSPIROSIS SOCIETY (WHO). **Human Leptospirosis:** Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control. Geneva: World Health Organization/International Leptospirosis Society; 2003.

CAPÍTULO 2 – OCORRÊNCIA E FATORES DE RISCO DA LEPTOSPIROSE CANINA NO MUNICÍPIO DE UBERLÂNDIA, MG

RESUMO – O cão no ambiente urbano é uma das principais fontes de transmissão da Leptospirose ao ser humano por estabelecer contato direto e poder eliminar leptospiras vivas na urina por vários meses de forma assintomática. O objetivo desta pesquisa foi verificar a ocorrência da leptospirose em cães domiciliados da área urbana, no município de Uberlândia, Minas Gerais, bem como, os fatores de risco relacionados à epidemiologia da doença. Foram examinadas 268 amostras de soro sanguíneo de cães de diferentes bairros pertencentes aos distritos sanitários Norte, Sul, Leste, Oeste e Central, colhidas durante a campanha de vacinação anti-rábica animal, em agosto de 2008. A leptospirose foi diagnosticada pela técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM), com uma coleção de doze sorovares. As variáveis analisadas foram sexo, idade, vacinação prévia, ambiente, presença de ratos e histórico de leptospirose humana ou animal. Determinou-se uma ocorrência de 28,36% (76/268) e os cães foram reagentes aos sorovares Autumnalis (34,21%), Tarassovi (23,58%), Canicola (17,11%) e Grippotyphosa (14,47%). Os resultados obtidos foram analisados pelo teste de Qui-quadrado (α=0,05) e a verificação da existência de correlações significantes, efetuada por meio da determinação do Coeficiente de Contingência. Dentre os fatores de risco observou-se que não houve diferença estatística significante entre localização, idade, histórico vacinal, ambiente, acesso à rua, presença de roedores e ocorrência de leptospirose animal e/ou humana. Entretanto, quanto ao sexo os machos foram mais reagentes a *Leptospira* spp. quando comparados às fêmeas. O distrito sanitário Leste apresentou um maior número de cães reagentes. Sendo assim, pode-se concluir que a leptospirose ocorreu em 28,36% dos cães no município de Uberlândia e deve ser prevenida, pois pode representar risco para a saúde pública.

Palavras-chave: Cães, *Leptospira interrogans*, sorovares.

CHAPTER 2 – OCCURRENCE AND RISK FACTORS OF CANINE LEPTOSPIROSIS IN UBERLÂNDIA, MG

ABSTRACT – The dog in the urban environment is one of the main sources of transmission of the Leptospirosis to the human, whom had direct contact, beyond being able to eliminate leptospiras alive in piss for some months in assintomático way. The objective of this work the occurrence of leptospirosis in dogs, the city of Uberlândia, Minas Gerais, as well as, the related factors of risk to the epidemiologia of the illness. 268 samples of sanguineous serum of dogs of different harvested quarters of the city during the dog rabies vaccination campaign had been examined, in August of 2008. Leptospirosis was diagnosised by the Microscopic Agglutination Test (MAT), with a collection of twelve sorovares. The analyzed variable had been sex, age, previous, surrounding vaccination, presence of rats and description of human leptospirosis being or animal. The joined occurrence was of 28,36%, being sorovares Autumnalis (34,21%), Tarassovi (23.58%), Canicola (17,11%) and Grippotyphosa (14,47%) most frequent. The gotten results had been analyzed statistical by the Qui-square test, with level of significance established in 0,05 and the verification of the existence of statistical significant correlations was effected through the Coefficient of Contingency. Amongst the risk factors it was observed that it did not have difference statistics between localization, age, vaccine, surrounding description, access to the street, presence of rodents and animal occurrence of leptospirosis and/or human being. How much the sex the males more had been premade use the Leptospirosis when compared the females. Leptospirosis occurs in dogs in the city of Uberlândia and must be prevented, therefore can represent risk for the health publishes for being one zoonose.

Key Words: Dogs, *Leptospira interrogans*, serovars.

INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença infectocontagiosa de distribuição mundial, caracterizada por ser uma zoonose que acomete animais domésticos, silvestres e a espécie humana (BATISTA et al., 2004). Segundo Ribeiro et al. (2003), o rato de esgoto (*Rattus novergicus*) e os cães são os principais reservatórios da leptospirose no ambiente urbano, portanto, sendo importantes na transmissão da doença para a espécie humana. Para Magalhães et al. (2006), a doença é mais comum em áreas próximas as favelas, pois normalmente nestes locais há falta de saneamento básico levando uma maior exposição das populações humana e canina aos roedores.

Para Jaszczerski (2005) melhorias nas condições de moradia, com instalação de redes de esgoto, drenagem de áreas alagadas e um sistema de coleta de lixo eficiente são importantes medidas a serem adotadas para diminuição da leptospirose na população humana. A vacinação dos animais susceptíveis mostra-se como uma forma bastante eficiente para o controle da doença nos mesmos e consequentemente, em seres humanos.

A doença tem maior prevalência nas regiões de clima tropical, quente e úmido e em locais de pobres condições sanitárias (BROWN; PRESCOTT, 2008). No Brasil a zoonose é endêmica, com a maior parte dos casos ocorrendo nas épocas de maior precipitação pluviométrica. No país a manutenção do agente no meio é favorecida pela vasta população de roedores e pelo clima tropical úmido.

Mello; Manhoso (2007) apresentaram a situação da leptospirose canina no Brasil mapeando a ocorrência e os sorovares mais prevalentes no país, que foram Canicola, Copenhageni, Icterohaemorrhagiae seguido pelo Autumnalis. A média das prevalências encontradas por Boechad; Machado (2004) em todo país foi de 26%.

Em trabalho realizado na determinação da prevalência de aglutininas anti-*Leptospira interrogans* em cães de Belo Horizonte, Minas Gerais, de 2001 a 2002, encontraram 13,1% animais positivos albergando principalmente os sorovares Canicola, Ballum, Pyrogenes e Icterohaemorhragiae (MAGALHÃES et al., 2006).

A infecção crônica observada em cães faz com que estes eliminem bactérias vivas pela urina por longos períodos, de forma assintomática. Tal fato associado ao estreito contato existente entre os cães e o ser humano faz com que o cão seja a

principal fonte de infecção da leptospirose humana no ambiente urbano, o que torna as investigações de soroprevalência da leptospirose canina relevantes, além de ser importante a caracterização dos sorovares predominantes em cada região geográfica para se estabelecer adequadas medidas de controle da doença.

Segundo Oliveira et al. (2009) a incidência da Leptospirose humana tem crescido em países da América Latina associada aos desastres naturais e ao crescimento desordenado das cidades. No Brasil, em 2008, de acordo com o Ministério da Saúde foram registrados 3.306 casos, sendo 949 na região sudeste e 63 no estado de Minas Gerais. Segundo a Vigilância Epidemiológica da Prefeitura Municipal de Uberlândia, no ano de 2008 foram registrados no município 11 casos suspeitos e dois casos confirmados de leptospirose humana.

O presente trabalho objetivou investigar a ocorrência da leptospirose em cães, bem como, os principais fatores de riscos relacionados à doença no município de Uberlândia, Minas Gerais.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no município de Uberlândia que situa-se no Triângulo Mineiro, em Minas Gerais limitado pelas coordenadas geográficas 18º 30' e 19º 30' de latitude sul e 47º 50' e 48º 50' de longitude oeste com uma área de 4115,09Km^2. Apresenta clima tropical com pluviosidade anual de 1500 mm e temperatura média de 22º C (BRITO; PRUDENTE, 2005).

O experimento foi conduzido durante a 26ª Campanha de Vacinação anti-rábica animal etapa urbana, em agosto de 2008. O dimensionamento da amostra foi determinado baseando em uma prevalência esperada de 26%, a qual corresponde à prevalência média da leptospirose canina no Brasil, conforme Boechat; Machado (2004), totalizando 268 cães (Apêndice A).

Em cada posto o número de amostras foi determinado por sorteio probabilístico aleatório de acordo com a chegada dos cães nos postos de vacinação anti-rábica. O roteiro e endereços foram selecionados aleatoriamente com exceção dos postos previamente selecionados localizados em áreas de elevada densidade canina a fim de ter representatividade dos distritos sanitários do município. Estas informações foram gentilmente cedidas pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da Secretaria de Saúde da Prefeitura Municipal de Uberlândia (PMU), Minas Gerais.

A colheita de sangue dos cães foi realizada em 60, dos 300 postos fixos de vacinação distribuídos nos cinco distritos sanitários do município: Central, Norte, Leste, Oeste e Sul (Figura 1). Após prévia vacinação anti-rábica e autorização dos proprietários foram selecionados aleatoriamente cinco cães por posto.

Para realização do exame sorológico de leptospirose foram colhidos cinco mL de sangue por meio da veia cefálica acessória, com seringas de cinco mL e agulha 25x7 estéreis, após anti-sepsia prévia com álcool. As amostras foram acondicionadas em tubos sem anticoagulante para extração do soro e mantidas refrigeradas (2 a 8ºC). O material foi transportado ao Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (FAMEV-UFU) e centrifugado a 2.500 rpm, durante cinco minutos. Em seguida, as amostras de soro foram acondicionadas em microtubos de polietileno de fundo cônico e congeladas a -20º C até a realização da SAM.

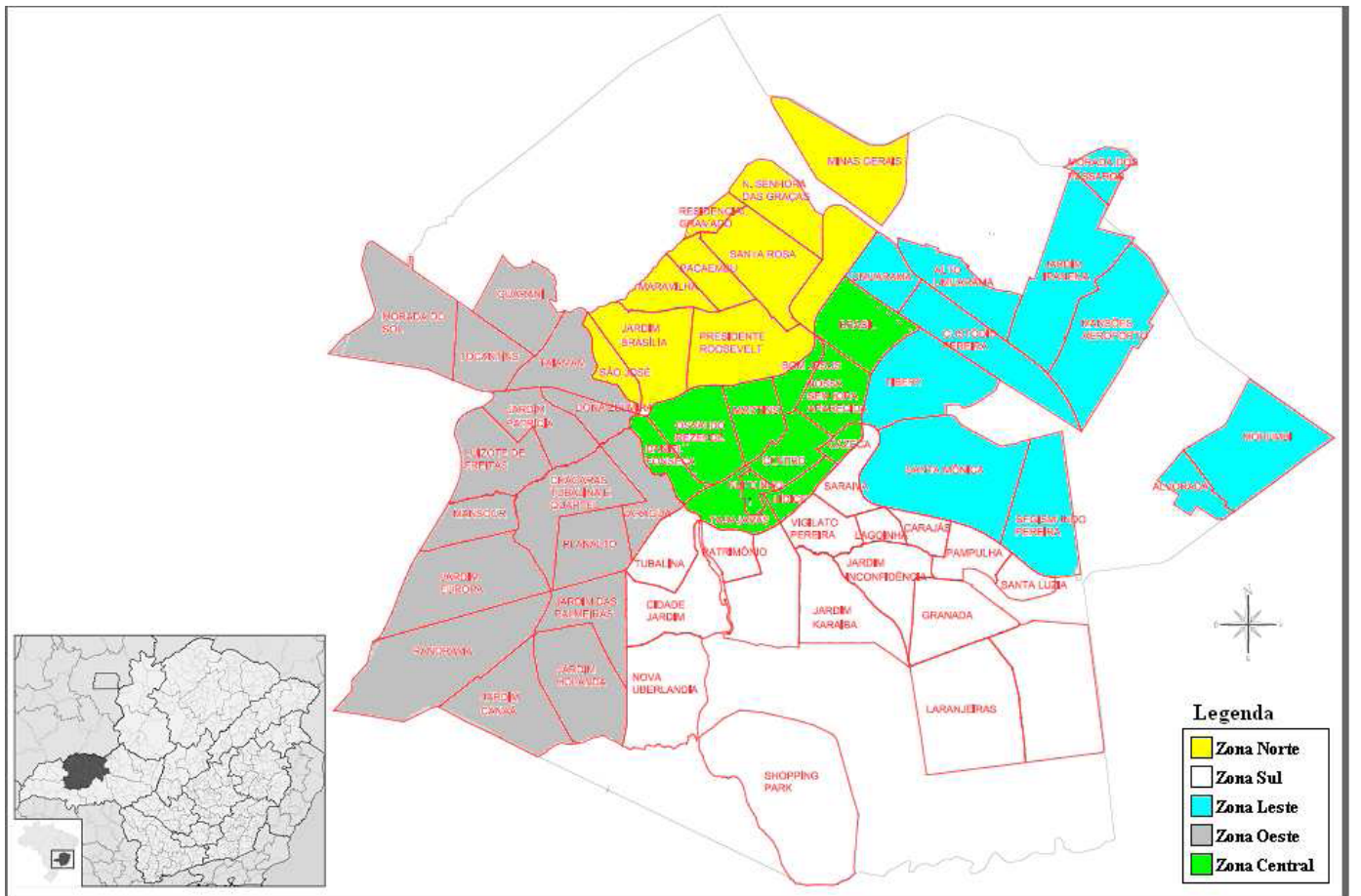


Figura 1. Zona urbana do município de Uberlândia, MG, Brasil, 2008*.

---

* Representação cartográfica adaptada: na escala de 1: 200.000m,

Atualizado em maio de 2009. http://www3.uberlandia.mg.gov.br/midia/documentos/planejamento_urbano/mapa_base_udia.pd

As análises sorológicas foram processadas conforme Brasil (1995) e Magalhães et al. (2006) e, por meio do teste de Soroaglutinação microscópica (SAM), padrão ouro no diagnóstico da leptospirose humana e animal, padronizado pelo Ministério da Saúde, com uma coleção de 12 antígenos vivos que incluíram os sorovares Autumnalis, Australis, Bataviae, Bratislava, Canicola, Grippotyphosa, Hardjo, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Tarassovi e Wolffi.

Os antígenos foram preparados a partir de matrizes mantidas Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da UFU, repicadas semanalmente em meio de cultura EMJH (Difco®), enriquecido com 10% de soro de coelho, mantido em estufa a 30ºC e utilizados próximo ao terceiro dia de incubação, livre de contaminação e de auto-aglutinação. Para determinação dos cães sororeagentes, foi utilizada a diluição de 1:100, considerando-se amostras reagentes, as quais apresentaram aglutinação igual ou superior a 50% (BRASIL, 1995).

Um inquérito epidemiológico foi realizado com a aplicação de um questionário a fim de se avaliar fatores de risco inerentes à ocorrência da doença (Apêndice B). Investigou-se localização, sexo, idade, histórico vacinal, ambiente, acesso à rua, presença de roedores e ocorrência de leptospirose animal e/ou humana.

Os resultados obtidos foram analisados pelo teste de Qui-quadrado, com nível de significância estabelecido em 0,05 e a verificação da existência de correlações significantes foi efetuada pelo Coeficiente de Contingência C. Utilizou-se também a estatística descritiva com medidas de posição e dispersão (SIEGEL, 1975).

Foi realizada uma abordagem geográfica do município com coleta de dados dos arquivos da Prefeitura Municipal de Uberlândia (PMU), do Banco de dados Integrados de 2008[2], Vigilância Epidemiológica e Centro de Controle de Zoonoses (CCZ). Avaliou-se por distrito sanitário o saneamento ambiental com relação a localização de áreas periféricas com baixa infra-estrutura, aterro sanitário, coleta de lixo, notificação de roedores e casos de leptospirose humana e áreas de alagamento decorrente de enchentes durante o ano de 2008. Estes dados foram correlacionados com os distritos sanitários com ocorrência de cães reagentes contra *Leptospira* spp.

O experimento foi conduzido de acordo com normas e aprovação do Comitê de Ética na Utilização de animais da Universidade Federal de Uberlândia (Anexo 1).

---

[2] http://www3.uberlandia.mg.gov.br/midia/documentos/planejamento_urbano/bdi_2008_vol1.pdf

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 268 amostras de soro sanguíneo analisadas, 76 apresentaram reagentes à SAM, obtendo-se uma ocorrência de 28,36%. Os sorovares de maior frequência foram o Autumnalis (34,21%), Tarassovi (23,68%) seguido pela sorovariedade Canicola (17,11%) e Grippotyphosa (14,47%), demonstrados na Tabela 1. Não foram detectados cães sororeagentes aos sorovares Hebdomadis, Bataviae e Hardjo.

Tabela 1- Frequência de sorovares em 76 amostras de soro de cães reagentes domiciliados em Uberlândia, MG, 2008.

SOROVAR	CÃES SOROREAGENTES FREQUÊNCIA ABSOLUTA	FREQUÊNCIA PERCENTUAL (%)
Autumnalis	26	34,21
Tarassovi	18	23,68
Canicola	13	17,11
Grippotyphosa	11	14,47
Bratislava	3	3,95
Icterohaemorragiae	2	2,63
Australis	1	1,32
Pomona	1	1,32
Wolffi	1	1,32
TOTAL	**76**	**100,00**

A ocorrência da doença neste percentual elevado em cães demonstra que a leptospirose é uma doença comum e muito provavelmente subestimada devido a grande quantidade de animais assintomáticos, embora cronicamente afetados.

Dos animais sororeagentes, 15 cães (19,73 %) apresentaram anticorpos a mais de um sorovar de *Leptospira* spp. (Tabela 2). Nos casos de coaglutinação considerou-se reagente a sorovariedade de maior titulação. Tal fato pode ser explicado devido exposição a mais de um sorovar, à diversidade de reservatórios e ambientes aos quais os animais se expõem (BARWICK et al., 1998).

Em estudo realizado por Magalhães et al. (2006) em Belo Horizonte, MG, a prevalência encontrada foi de 13,1% em cães recolhidos pelo Centro de Controle de

Zoonoses oriundos de domicílios e cães errantes. Já Batista et al. (2004) em Patos, PB, encontraram uma soroprevalência de 20%, no entanto, avaliaram apenas cães errantes.

Tabela 2- Coaglutinação de diferentes sorovares de *Leptospira* spp. em cães domiciliados no município de Uberlândia, MG, 2008.

SOROVARES	FREQUÊNCIA ABSOLUTA	FREQUÊNCIA RELATIVA %
Autumnalis+Brastislava + Pomona	2	13,32
Autumnalis+Tarassovi	2	13,32
Autumnalis+ Grippotyphosa	2	13,32
Autumnalis+ Icterohaemorrhagiae	2	13,32
Autumnalis+ Pomona	1	6,66
Autumnalis+Brastilava	1	6,66
Autumnalis+ Canicola	1	6,66
Brastilava+Canicola	1	6,66
Brastilava+Wolffi	1	6,66
Canicola+Grippotyphosa+Tarassovi	1	6,66
Canicola+Tarassovi	1	6,66
TOTAL	**15**	**100**

Comparando os resultados da presente investigação com outras conduzidas em diferentes cidades do país, verifica-se que o percentual de cães reagentes encontrados (28,36%) foi superior ao encontrado por Batista et al. (2005) no município de Campina Grande, PB (21,4%) e Silva et al. (2006) em Botucatu, SP (17,9%). Estas pesquisas foram realizadas durante a campanha de vacinação anti-rábica com seleção aleatória dos animais pertencentes a diferentes localidades.

Ávila et al. (1998) em Pelotas, RS e Querino et al. (2003) em Londrina, PR, encontraram prevalências superiores, 34,8% e 30,52%, respectivamente. Isto possivelmente se deve ao fato dos autores terem utilizados em suas pesquisas amostras de cães com suspeita clínica de leptospirose.

As diferenças na porcentagem de positividade provavelmente são devido à variedade de fatores que influenciam na ocorrência da leptospirose, como topografia, temperatura, umidade, precipitações pluviométricas, reservatórios domésticos, reservatórios selvagens, bem como, a diferença das populações caninas estudadas (BATISTA et al., 2005).

A maior incidência do sorovar Autumnalis (35,53%) também foi identificado nos resultados obtidos por Batista et al. (2004) e Aguiar et al. (2007) que apresentaram 20% e 22,2% de cães sororeagentes frente ao sorovar Autumnalis, respectivamente. Aguiar et al. (2004) justificaram que o aparecimento de sorovares incomuns pode ser explicado pelo fato do compartilhamento do ambiente por diferentes espécies animais, o que pode promover a associação e adaptação de agentes a novos hospedeiros.

Os resultados da analise estatística das variáveis analisadas no inquérito epidemiológico encontram-se descritas na Tabela 3.

Dos 268 cães avaliados 110 eram machos e 158 fêmeas, de diferentes raças e idades. Os machos apresentaram 31,81% de sororeatividade enquanto as fêmeas, 25,94%. Nesta pesquisa, a variável sexo foi determinada como fator de risco associado a infecção por leptospiras, pois, observou-se correlação estatisticamente significante entre animais sororeagentes e o sexo.

Os machos foram mais acometidos pela Leptospirose quando comparados às fêmeas na presente pesquisa. No entanto, estudos realizados por Batista et al. (2004) não encontraram diferenças entre os sexos. Enquanto que, esta predisposição dos machos serem mais acometidos por *Leptospira* spp. também foi observada por Silva et al. (2006) e Aguiar et al. (2007), para os quais o resultado encontrado foi inesperado. A maior ocorrência nos machos pode estar relacionada ao comportamento social deste sexo, o qual representa maior pressão na reprodução podendo ter um maior acesso a rua e maior exposição a patógenos quando comparados a vida reprodutiva das fêmeas.

Tabela 3 - Cães reagentes contra *Leptospira* spp. de acordo com variáveis analisadas no inquérito epidemiológico como possíveis fatores de risco na ocorrência da leptospirose canina, no município de Uberlândia, MG, 2008.

VARIÁVEL	CÃES		$\gamma^{2\,a}$	C^b
	TOTAL	REAGENTE		
Sexo				
Macho	110	35	47,18	0,14
Fêmea	158	41		
Idade				
≤ 1 ano	153	46	0,51	-
> 1 ano	115	30		
Ambiente				
Domiciliar Urbano	240	71	0,81	-
outros*	28	05		
Vacinação				
Sim	74	46	0,08	-
Não	194	30		
Histórico de Leptospirose				
Sim	14	02	-	-
Não	254	74		
Presença de roedores				
Sim	151	45	0,35	-
Não	117	31		
Terrenos baldios				
Sim	156	48	1,07	-
Não	112	28		
Acesso à rua				
Sim	124	32	0,74	-
Não	144	44		

[a]Valores de Qui-quadrado
[b] Coeficiente de Contigência
γ^2calculado > γ^2crítico^{3,84} existe ≠ significativa
$p<0,05$
*incluiu rural e canil.

As variáveis idade, vacinação prévia, ambiente, acesso a rua, presença de roedores, terrenos baldios, histórico de leptospirose animal e/ou humana não foram significantes como fatores de risco. No entanto, o acesso à rua foi apontado por Silva et al. (2006) e por Querino et al. (2003) como um importante fator de risco para ocorrência da leptospirose em cães, uma vez que este hábito propicia inúmeras

possibilidades de infecção pelo contato direto e indireto com outros animais ou pelo acesso a áreas alagadiças.

Quanto ao protocolo vacinal apenas 18 cães (6,72%) receberam vacina déctupla composta pelos sorovares Icterohaemorrhagiae, Grippotypphosa, Canicola e Pomona. Destes, apenas dois cães apresentaram protocolo vacinal combinado com as vacinas contra a gripe canina e giardíase. Identificou-se 56 cães (20,89%) imunizados com a vacina óctupla contra os sorovares Canicola e Icterohaemorrhagiae, enquanto que, 194 cães (72,38%) não receberam qualquer tipo de imunização contra *Leptospira* spp. Todos os animais do presente estudo foram imunizados contra o vírus da raiva.

Do total de 268 cães, 74 (27,61%) receberam durante a vida algum tipo de imunização anti-*Leptospira* spp. embora não se avaliou tempo decorrente após a imunização, não sendo possível a distinção de anticorpos decorrentes de infecção natural ou pós-vacinal.

Dos 76 cães sororeagentes, 46 (60,52%) receberam algum tipo de vacinação anti-*Leptospira interrogans* e 30 (39,48%) nunca foram imunizados contra a doença. Tal fato pode ser explicado devido a resposta ser sorovar específica. Um animal vacinado pode entrar em contato com sorovares que não estejam presentes na vacina, podendo se infectar, além da possibilidade de tempo inadequado de realização dos reforços vacinais, pois não foi considerado o período entre a vacinação e a colheita de sangue (JASCZERSKI, 2005).

A presença de roedores no ambiente que o cão avaliado habitava foi notada em 59,20% dos casos, terrenos baldios e abrigo para ratos em 63,15%. O tipo de ambiente que os cães viviam foi predominantemente domiciliar urbano, uma vez que, a pesquisa foi realizada no perímetro urbano do município. Em trabalho realizado por Aguiar et al. (2007) cães do ambiente rural demonstraram maior soropositividade quando comparado aos de área urbana.

A amplitude de variação da faixa etária foi de cinco meses a 15 anos. Os machos tiveram idade média de quatro anos (±3,7) e as fêmeas de três anos (±2,1). A idade não foi considerada fator de risco significante na ocorrência da leptospirose canina no presente estudo diferindo de Batista et al. (2005) e Aguiar et al. (2007) os quais verificaram um maior número de cães sororeagentes com idade superior a um

ano. Silva et al. (2006) verificaram uma maior ocorrência da doença em cães com mais de cinco anos. Possivelmente, se deve ao fato de que animais mais velhos tiveram mais tempo para entrar em contato com o agente etiológico, além disso, filhotes apresentam cuidados maiores por parte dos proprietários resultando em baixos índices de ocorrência da doença nessa faixa etária.

A distribuição da frequência da doença relacionada à localização no município encontra-se na Figura 2. Observou-se uma baixa ocorrência da doença na zona central do município que pode estar relacionada com maior efetividade no saneamento básico. Os cães da zona leste foram os mais afetados constituindo uma maior frequência da doença.

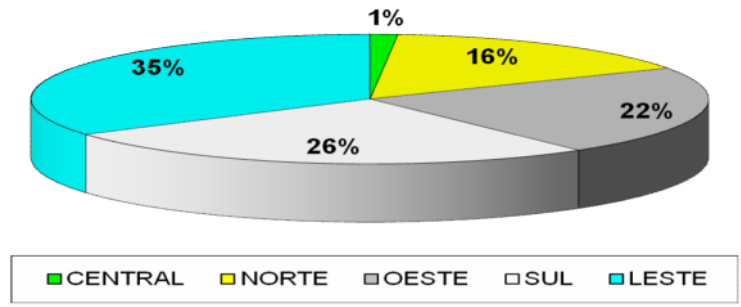


Figura 2- Frequências de cães reagentes contra *Leptospira* spp. de acordo com a localização no distrito sanitário do município de Uberlândia, MG, 2008.

De acordo com Figueiredo et al. (2001) a leptospirose detectada em humanos em Belo Horizonte, MG, ocorreu principalmente nas áreas de bolsões de pobreza, com grande densidade populacional e carência de infra-estrutura. Na distribuição espacial a doença esteve presente em maior percentual em áreas com maior concentração de redes fluviais. Dentre os indivíduos avaliados 12% tiveram contato com a água ou animais contaminados, demonstrando assim, a importância do cão na cadeia epidemiológica da doença na zona urbana.

De acordo com a Defesa Civil da PMU, MG, as áreas de emergência pluviométricas estão distribuídas por todas as bacias de córregos e rio que passam pelo município. No ano de 2008 houve registros de emergências pluviométricas com precipitações elevadas em principais locais como Av. Governador Rondon Pacheco, Av. Minervina Cândida e Av. Getúlio Vargas, no entanto, estas são vias urbanas que ligam os principais pontos de Uberlândia e atravessam o município e geograficamente pertencem a vários bairros e a mais de um distrito sanitário, não sendo possível correlacionar com os casos de leptospirose canina.

No entanto, alguns pontos se destacaram nesta avaliação, como o bairro Morumbi, que apresentou cães sororeagentes e localiza-se no distrito sanitário leste de maior ocorrência da doença. Este bairro foi alagado em 2008 diversas vezes no período chuvoso em situação crítica havendo a necessidade de implementar rotas alternativas para acesso ao bairro até regularização do nível de água[3].

A ocorrência de enchentes é um fator de risco para a leptospirose canina, pois durante as épocas chuvosas ocorre maior facilidade de disseminação do agente, eliminado pela urina de roedores e outras fontes de infecção, expondo os animais e o humano ao risco da infecção (BATISTA et al., 2005; MASCOLLI et al., 2002).

Querino at al. (2003) definiram que a presença de áreas alagadiças próximas as residências é considerado um fator de risco para a leptospirose canina. É importante limitar o acesso dos cães a áreas pantanosas, lamacentas, lagos e áreas alagadiças como medida de prevenção da doença (MELLO; MANHOSO , 2007).

De acordo com os dados registrados pelo CCZ da PMU, no ano de 2008 o maior número de notificações de ocorrência de roedores e solicitação de serviço de controle foi identificado no distrito sanitário Norte, seguido pelo Leste (Tabela 4), no qual se verificou um maior número de cães que apresentaram anticorpos anti-*Leptospira* spp. Foi observado também que a região Central teve um menor número de registros e foi o distrito com um menor percentual de cães reagentes contra *Leptospira* spp.

Os roedores são considerados hospedeiros de manutenção de diversos sorovares e contribuem para a contaminação ambiental permitindo assim a possível

[3] Dados fornecidos pela Defesa Civil da PMU. <http://www.uberlandia.mg.gov.br/index.php>

infecção do cão e do ser humano. Lopes et al. (2005) consideraram o contato dos cães com roedores um fator de risco, uma vez que, a presença de ratos está intimamente ligada ao aparecimento da doença.

Tabela 4 – Notificações de roedores de acordo com os distritos sanitários de Uberlândia, MG, durante o ano de 2008.

DISTRITOS SANITÁRIOS	NOTIFICAÇÕES
Norte	353
Leste	342
Oeste	319
Sul	270
Central	269

Fonte: CCZ, PMU

A coleta de lixo no município de Uberlândia tem sido realizada diariamente no distrito sanitário Central e três vezes por semana nos demais distritos. O aterro sanitário localiza-se no setor Norte e neste verificou-se um maior número de notificações de roedores, enquanto que, no Central observou-se um menor registro de roedores e de cães reagentes contra *Leptospira* spp.

A incidência da leptospirose humana tem elevado na América Latina devido ao crescimento desordenado das cidades e aos desastres naturais (OLIVEIRA et al., 2009). De acordo com dados da Vigilância Epidemiológica da Prefeitura Municipal de Uberlândia no ano de 2008 foram notificados apenas dois casos confirmados de leptospirose humana, sendo um proveniente da área rural e outro provindo do distrito sanitário oeste da zona urbana do município. Estes dados podem estar aquém da realidade devido a falta de confirmação e notificação dos casos humanos.

Tal fato pode ser sustentado pela avaliação feita nos registros do Laboratório de Doenças Infeccontagiosas da UFU e de laboratórios particulares. Em um levantamento realizado de exames sorológicos de SAM de Leptospirose humana realizados nos últimos três anos (2007 a 2009) ao serem confrontados com os dados oficiais de notificação verificou-se um número maior de casos registrados confirmados de pacientes provindos do município de Uberlândia, MG, neste mesmo período, conforme Tabelas 5, 6 e 7.

Tabela 5 - Casos de Leptospirose humana em Uberlândia, MG, classificados conforme ano de notificação.

CLASSIFICAÇÃO FINAL	ANO		
	2007	2008	2009
Aguarda Resultado	0	0	2
Confirmado	0	2	0
Descartado	8	12	12
Total	8	14	14

Fonte: Vigilância Epidemiológica/ Sinannet 2007, 2008, 2009, Uberlândia - MG.

No ano de 2008 foram identificados nos exames sorológicos humanos, pacientes reagentes ao sorovar Tarassovi (Tabelas 6 e 7), o qual foi o segundo sorovar mais prevalente na população canina avaliada. A ocorrência deste sorovar pode estar relacionada com uma fonte de infecção comum as duas espécies, ou ainda que, realmente o cão pode ser a fonte de infecção para o ser humano.

Tabela 6 – Resultados da SAM* de Leptospirose humana realizados no Laboratório de Doenças Infeccontagiosas da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, MG, no período de 2007 a 2009.

EXAMES REGISTRADOS	ANO		
	2007	2008	2009
Casos suspeitos	5	11	7
Exames negativos	3	9	6
Exames positivos	2	2	1
Sorovares identificados	Canicola Hardjo	Tarassovi	Wolffi Grippothyphosa

Fonte: Arquivos do Laboratório de Doenças Infeccontagiosas da Faculdade de Medicina Veterinária/ UFU 2007, 2008, 2009, Uberlândia - MG.
*Técnica de Soroaglutinação Microscópica em campo escuro

Tabela 7 - Resultados da SAM* de Leptospirose humana realizados em Laboratórios particulares do município de Uberlândia, MG, no período de 2007 a 2009.

	ANO		
EXAMES REGISTRADOS	**2007**	**2008**	**2009**
Casos suspeitos	10	8	9
Exames negativos	10	6	9
Exames positivos	0	2	0
Sorovares identificados	-	Bataviae, Canicola Copenhageni Djasiman Icterohaemorrhagiae Panama,Patoc, **Tarassovi,** Wolffi	-

Fonte: Arquivos de Laboratórios Particulares-Divisão Humana, no período de 2007, 2008 e 2009, Uberlândia, MG.
*Técnica de Soroaglutinação Microscópica em campo escuro

Observa-se na Figura 3, a distribuição dos cães sororeagentes nas cinco zonas do município de Uberlândia, MG. Segundo Magalhães et al. (2006) as áreas de maior risco de leptospirose em cães na cidade de Belo Horizonte, MG, coincidiram com as regiões de vila, favelas e bairros da periferia, os quais possuíam deficiência de saneamento ambiental.

De acordo com Ramires; Santos (2001) as áreas periféricas de Uberlândia localizam-se na região leste do município, áreas de invasão que atualmente se emanciparam como bairros, como Dom Almir, Prosperidade, Joana Darc e São Francisco, no entorno do bairro Morumbi, apresentam características de assentamentos urbanos com loteamentos irregulares, condições insalubres com infraestrutura precária, falta de saneamento e urbanização inadequada, o que ocasiona grandes impactos para a saúde humana.

No presente estudo o distrito sanitário Leste também foi o que apresentou maior percentual de cães reagentes contra *Leptospira* spp. corroborando com Brown; Prescott (2008) Neste local observou-se em maiores proporções, conglomerados de áreas periféricas e bairros com déficits infra-estruturais, com

deficiência no saneamento básico de água e esgoto. O bairro Tibery foi o que apresentou um maior número de cães reagentes, com seis cães sororeagentes.

Vale salientar que os cães deste estudo não apresentavam sintomatologia clínica da doença e que provavelmente albergavam a bactéria de forma assintomática, servindo como reservatórios da doença, podendo infectar o ser humano e manter a cadeia epidemiológica do agente.

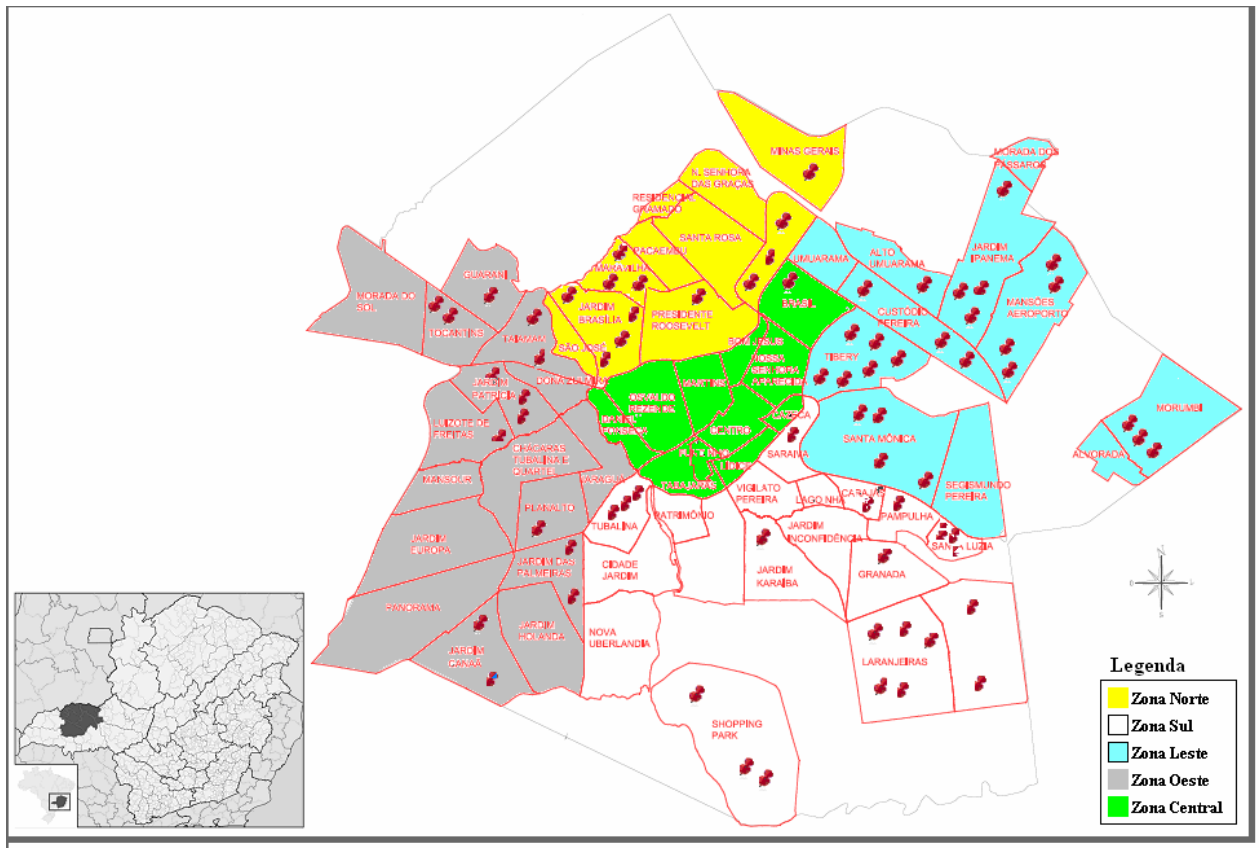


Figura 3- Representação gráfica da distribuição dos 76 cães sororeagentes a *Leptospira* spp. de acordo com os bairros e zonas do município que coabitam, durante a campanha da raiva, Uberlândia, MG, 2008 *.

Cães sororeagentes

* Representação cartográfica adaptada: na escala de 1: 200.000m,

Atualizado em maio de 2009. http://www3.uberlandia.mg.gov.br/midia/documentos/planejamento_urbano/mapa_base_udia.pdf

CONCLUSÃO

A ocorrência da leptospirose em cães no município de Uberlândia foi de 28,36%. Os sorovares mais frequentes foram o Autumnalis (34,21%) seguido por Tarassovi (23,68%), Canicola (17,11%) e Grippotyphosa (14,47%). Os machos foram mais acometidos pela Leptospirose quando comparados às fêmeas. Não houve correlação estatisticamente significante com os demais fatores de risco analisados.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, D.M.; CAVALCANTE, G.T.; MARVULO, M.F.V.; SILVA, J.C.R.; PINTER, A.; VANCONCELLOS, S.A.; MORAIS, Z.M.; LABRUNA, M.B.; CAMARGO, L.M.A.; GENNARI, S.M. 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**, v 59, n 1, p 70-76, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v59n1/12.pdf>. Acesso em: 15 jul 2008.

ÁVILA, 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 influencia do Centro de Controle de Zoonoses, Pelotas, RS, Brasil, no ano de 1995. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.28, n. 1, p. 107-110, 1998. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cr/v28n1/a18v28n1.pdf>. Acesso em 21 mai 2008.

BARWICK R.S.; MOHAMMED H.O.; MCDONOUGH P.L.; WHITE M.E. “Epidemiologic features of equine Leptospira interrogans of human significance”, **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v.36, n.2, p.153-165, 1998. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/journal/01675877>. Acesso em: 20 jun 2008.

BATISTA, C.S.A; AZEVEDO, S.S.; ALVES, C.J.; VASCONCELLOS, S.A.; MORAIS, M.; CLEMENTINO, I.J.; LIMA, F.S.; ARAUJO NETO, J.O. Soroprevalência de leptospirose em cães errantes da cidade de Patos, Estado da Paraíba, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n.2, p. 131-136, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/bjvras/v41n2/25230.pdf>. Acesso em: 22 jun 2008.

BATISTA, C.S.A.; ALVES, C.J.; AZEVEDO, S.S.; VASCONCELLOS, S.A.; MORAIS, Z.M.; CLEMEMTINO, I.J.; ALVES, F.A.L.; LIMA, F.S.; ARAÚJO NETO, J.O. Soroprevalência e fatores de risco para a leptospirose em cães de Campina Grande,

Paraíba. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, suplemento 2, p. 179-185, 2005. Disponível em: < http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v57s2/28320.pdf>. Acesso em: 22 jun 2008.

BOECHAT, J.U.D.; MACHADO, J.P. Prevalência da leptospirose canina no Brasil. **Veterinária Ser**, São Paulo, v.1, n.1, p.40-47, 2004.

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

BRITO, J.; PRUDENTE, T.D. Mapeamento do uso da terra e cobertura vegetal do município de Uberlândia-MG, utilizando imagens ccd/cbers2. **Caminhos da Geografia**, Uberlândia, v.13, n.15, p. 144-153, 2005. Disponível em:< http://www.ig.ufu.br/revista/volume15/artigo13_vol15.pdf >. Acesso em: 15 ago 2008.

BROWN, K.; PRESCOTT, J. Leptospirosis in the family dogs: a public health perspective. **Canadian Medical Association Journal**, Canadá, v. 178, n. 4, p. 399-401, 2008. Disponível em:< http://www.cmaj.ca/cgi/content/full/178/4/399 >. Acesso em: 15 ago 2009.

FIGUEIREDO, C.M.; MOURÃO, A.C.; OLIVEIRA, M.A.A.; ALVES, W.R.; OOTEMAN, M.C.; CHAMONE, C.B.; KOURY, M.C. Leptospirose humana no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil: uma abordagem geográfica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 4, p. 331-338, Julho/Agosto, 2001.

JASZCZERSKI, D.C.F.C. **Cinética da resposta imune humoral em cães imunizados com *Leptospira interrogans* sorovares icterohaemorragiae, canicola, pomona e grippotyphosa.** 2005. 82 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

LOPES, A.L;S.; SILVA, W.B.; PADOVANI, C.R.; LANGONI, H.; MODOLO, J.R. Frequência sorológica antileptospírica em cães: sua correlação com roedores e fatores ambientais, em área territorial urbana. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.3, p. 289-296, 2005. Acesso em:< http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V72_3/lopes.PDF>. Acesso em: 16 ago 2008.

MAGALHÃES, D.F.; SILVA, J.A.; MOREIRA, E.C.; WILKE, V.M.L.; HADDAD, J.P.A.; MENESES, J.N.C. Prevalência de aglutininas anti-*Leptospira interrogans* em cães de Belo Horizonte, Minas Gerais, 2001 a 2002. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 2, p. 167-174, 2006. Acesso em:< http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v58n2/29657.pdf>. Acesso em: 16 ago 2008.

MASCOLLI, R.; PINHEIRO, S.R.; VASCONCELLOS, S.A; FERREIRA, F.; MORAIS, Z.M.; PINTO, C.O.; SUCUPIRA, M.C.A; DIAS, R.A.; MIRAGLIA, F.; CORTEZ, A.; SILVEIRA DA COSTA, S.; TABATA, R.; MARCONDES, A.G. Inquérito sorológico para leptospirose em cães do município de Santana de Paraíba, São Paulo, utilizando a campanha de vacinação anti-rábica do ano de 1999. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.69, n.2, p.25-32, 2002. Disponível em: < http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V69_2/mascolli.pdf>. Acesso em: 14 ago. 2008.

MELLO, L.P.P.; MANHOSO, F.F.R. Aspectos epidemiológicos da leptospirose canina no Brasil. **Unimar Ciências**, Marília, v.16, n.1-2, p.27-32, 2007. Disponível em: <http://www.unimar.br/publicacoes/2009/unimar_ciencias_16.pdf>. Acesso em: 16 jan.2008.

OLIVEIRA, D.S.C.; GUIMARÃES, M.J.B.; MEDEIROS, Z. Modelo produtivo para a leptospirose. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v.38, n.1, p. 17-26, 2009. Disponível em: < http://www.revistas.ufg.br/index.php/iptsp/article/view/6205 > Acesso em : 20 out. 2009.

QUERINO, A. M. V.; DELBEM, A. C. B.; OLIVEIRA, R. C.; SILVA, F. G.; MULLER, E. E.; FREIRE, R. L.; FREITAS, J. C. Fatores de risco associados à leptospirose em cães do município de Londrina-PR. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n.1, p. 27-34, 2003. Acesso em:< http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/2113/1814>. Acesso em: 16 ago 2008.

RAMIRES, J.C.L; SANTOS, M.A.F. Exclusão social em Uberlândia: algumas reflexões a partir do bairro Dom Almir e seu entorno. **Caminhos da Geografia**, Uberlândia, v.2, n.4, p. 73-87, 2001. Disponível em:< http://www.caminhosdegeografia.ig.ufu.br/include/getdoc.php?id=160&article=43&mode=pdf >. Acesso em: 15 set 2009.

RIBEIRO, M.G.; BELONI, S.N.; LANGONI, H.; SILVA, A.V. Leptospirose canina. **Boletim técnico**. Departamento Técnico Fort Dodge Saúde Animal, (S.I., s.n.), 2003. Disponível em: < http://www.duramunemax.com.br/boletins/boletimLepto.pdf>. Acesso em 05 jan. 2008.

SIEGEL, S. **Estatística não-paramétrica**, para as ciências do comportamento. Trad. Alfredo Alves de Farias. Ed. McGraw-Hill do Brasil. São Paulo, 1975. 350 p.

SILVA, W. B.; SIMÕES, L. B.; LOPES, A. L. S.; PADOVANI, C. R.; LANGONI, H.; MODOLO, J. R. Avaliação de fatores de risco de cães sororeagentes à *Leptospira* spp e sua distribuição espacial, em área territorial urbana. **Brazilian Journal Reserch of Animal Science**, São Paulo, v. 43, n. 6, p. 783-792, 2006.

CAPÍTULO 3 – LEPTOSPIROSE CANINA RELACIONADA A SAZONALIDADE NO MUNICÍPIO DE UBERLÂNDIA, MG

RESUMO – Objetivou-se avaliar a relação entre frequência de cães sororeagentes a *Leptospira* spp. com as variáveis climáticas do município de Uberlândia, Minas Gerais, bem como, determinar os principais sorovares presentes na população canina estudada. Devido o contato direto existente entre o ser humano e os cães, estes podem ser fonte de infecção para a leptospirose humana. A incidência da doença na América Latina aumenta associada ao crescimento desordenado da população e às condições climáticas que propiciam a manutenção do agente no meio, como altas temperaturas e ocorrência de enchentes. Foram examinadas 150 amostras de soro sanguíneo de cães hígidos domiciliados e rurais, de ambos os sexos e idades variadas. Sendo 75 coletadas no período seco (Junho à Novembro) e 75 no período chuvoso do ano (Dezembro à Maio). Todas as amostras foram submetidas ao exame de Soroaglutinação Microscópica (SAM). As frequências de cães sororeagentes nos diferentes períodos foram comparadas e relacionadas com as variáveis temperatura, umidade relativa do ar e precipitação pluviométrica, pelo do teste da binomial para duas proporções (α=0,05). Encontrou-se uma frequência de 38%, com o predomínio do sorovar Autumnalis (15,79%), seguido de Bratislava e Canicola (14,03%); Tarassovi (10,53%); Pomona e Icterohaemorrhagiae (8,77%). A presença de sorovares incomuns na espécie canina desperta a necessidade de se reconsiderar os procedimentos de prevenção da leptospirose, principalmente no tocante a produção de vacinas. Houve diferença significativa na ocorrência da leptospirose nos cães avaliados nos diferentes períodos do ano, com maior frequência de cães sororeagentes no período chuvoso.

Palavras-chave: *Leptospira interrogans*, precipitação pluviométrica, zoonoses.

CHAPTER 3 – RELATION OF CANINE LEPTOSPIROSIS AND SEASONALITY IN UBERLÂNDIA CITY, MG

ABSTRACT – This study aimed to assess the relation between the frequency of seropositives dogs for *Leptospira interrogans* with climatic variables in the city of Uberlândia, Minas Gerais, as well as determine the main serovars present in the canine population studied. The direct contact existing between canine and human it's an important source of infection. The incidence of the disease in Latin America countries increases associated with disorderly growth of the population and climatic conditions that favor the maintenance of the agent in the environmental as high temperatures, humidity, and occurrence of floods. Blood serum from 150 domiciled and rural dogs, of both sexes and several ages was investigated. Samples were collected in dry and wet periods of the year. All the animals were submitted to microscopic agglutination test (MAT). The frequencies of seropositive dogs in different periods were compared and related to the variables temperature, relative humidity and rainfall, using the nonparametric test of two binomial proportions ($p > 0.05$). The prevalence found was 38%, the most reactive serovars were Autumnalis (15.79%), followed by Bratislava and Canicola (14.03%); Tarassovi (10.53%); Icterohaemorrhagiae and Pomona (8.77%). It was noted a significant difference in the incidence of leptospirosis in dogs evaluated in the two periods of the year.

Key words: *Leptospira interrogans*, rainfall, zoonosis.

INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose cosmopolita que acomete grande variedade de espécies animais e seres humanos (OLIVEIRA; PIRES NETO, 2004). Considerada uma doença importante para a saúde pública, devido à facilidade na transmissão, com alta morbidade, apesar da baixa mortalidade (FAINE et al., 1999). No ambiente urbano, o cão é a principal fonte de infecção para o ser humano, por manter o agente por longo período nos rins, podendo eliminá-lo na urina sem apresentar sinal clínico. Este fato se agrava devido à relação direta que os cães mantêm com os seres humanos (MAGALHÃES et al., 2006; ADLER ; MOCTEZUMA, 2009).

A água contaminada com a urina de animais infectados por *Leptospira* spp. é a principal responsável pela disseminação da leptospirose aos organismos susceptíveis ao entrarem em contato com esta fonte (JOUGLARD; BROD, 2000). A transmissão ocorre ainda pelo contato com urina ou tecido de animais infectados, além da ingestão de água e alimentos contaminados com urina de ratos ou de outros animais domésticos, que mesmo vacinados podem ser portadores assintomáticos da bactéria (LEVETT, 2001). Minke et al. (2009) ressaltaram a importância de se vacinar os cães contra a leptospirose, pois a vacinação promove a proteção contra a doença clínica e o estado de portador renal prevenindo a transmissão da zoonose para o ser humano.

A doença encontra-se distribuída por todo o mundo, porém alguns sorovares de *Leptospira* spp. são encontrados com maior frequência em determinadas espécies ou em determinada área geográfica (OLIVEIRA; PIRES NETO, 2004). A infecção depende de fatores ambientais que permitam a sobrevivência das leptospiras fora do hospedeiro. Em climas quentes e úmidos, os microrganismos podem sobreviver por meses em água neutra ou levemente alcalina, com pH favorável entre 6 e 7,6 e temperatura ótima em torno de 28ºC (THIERMANN, 1984). A prevalência da infecção é alta em países tropicais, onde a precipitação pluviométrica e temperatura atingem índices elevados (ACHA; SZYFRES, 2003).

Magalhães et al. (2006) avaliaram a prevalência de aglutininas anti-*Leptospira interrogans* nos cães recolhidos pelo Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte, MG em diferentes épocas do ano. Encontrou-se 13,1% de cães

sororeagentes distribuídos principalmente nos meses de dezembro de 2001 a janeiro de 2002. Nestes períodos foram registrados maiores índices de precipitação pluvial e temperaturas médias.

Os cães, como todas as outras espécies de animais domésticos e silvestres, são susceptíveis a todos os sorogrupos de leptospiras conhecidos, embora a leptospirose canina clássica esteja ligada aos sorovares Canicola e Icterohaemorrhagiae que causam insuficiência renal aguda ou subaguda (ÁVILA et al., 1998). No Brasil, inquéritos sorológicos mostram a variabilidade da distribuição de sorovares de *Leptospira* spp. em diferentes regiões do país.

A epidemiologia da leptospirose é caracterizada por uma espécie de hospedeiro primário que atua como reservatório para cada sorovar. O cão é o reservatório para o sorovar Canicola, enquanto que, os ratos são considerados reservatórios do sorovar Icterohaemorrhagiae. Os demais sorovares estão associados a várias espécies de reservatórios como bovinos, equinos, suínos e animais selvagens, com destaque para os roedores e carnívoros (WARD, 2002).

Segundo Okewole; Ayoola (2009) a variação dos sorovares predominantes e mudança epidemiológica da leptospirose canina ocorreram devido as vacinas serem em sua maioria composta apenas dos sorovares Canicola e Icterohaemorrhagiae, não conferindo proteção frente aos sorovares emergentes mais patogênicos adaptados a outras espécies. A rápida urbanização permite o crescente contato dos animais de estimação com animais selvagens. Além disto, os autores determinaram uma correlação positiva do número de casos registrados no sudoeste da Nigéria com áreas litorâneas em que houveram elevados índices de precipitação pluviométrica.

A presente pesquisa teve como objetivo avaliar a relação entre a frequência de cães soreagentes a *Leptospira* spp. e a sazonalidade no município de Uberlândia, Minas Gerais, relacionando-se com os índices de precipitação pluviométrica, temperatura e umidade relativa do ar. Além disto, investigar os principais sorovares presentes na população canina estudada.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido durante o ano de 2008, no município de Uberlândia, localizado na região Triângulo Mineiro, Minas Gerais (MG). Limitado pelas coordenadas geográficas 18º 30' e 19º 30' de latitude sul e 47º 50' e 48º 50' de longitude oeste com uma área de 4115,09Km^2, com clima tropical e pluviosidade anual de 1500mm e temperatura média anual de 22º C (BRITO; PRUDENTE, 2005).

Foram examinadas 150 amostras de soro sanguíneo de cães domiciliados e rurais, de ambos os sexos e diferentes raças e faixa etária, sem histórico vacinal, oriundos de diferentes bairros do município de Uberlândia, MG. Os cães foram selecionados de modo aleatório e se encontravam hígidos na avaliação clínica. Realizaram-se colheitas mensais distribuídas no período de um ano, comparando-se os períodos seco (Junho à Novembro) e chuvoso (Dezembro à Maio), composto cada por 75 amostras de soro sanguíneo canino.

Foram colhidos cinco mL de sangue por meio da venopunção da veia Cefálica Acessória, com seringas de cinco mL e agulha 25x7, descartáveis e estéreis, após antissepsia prévia com álcool iodado. As amostras foram acondicionadas em tubos sem anticoagulante para extração do soro e mantidas sob refrigeração (2 a 8 ºC) em caixa isotérmica. Em seguida, realizou-se a centrifugação a 2.500 rpm, durante cinco minutos e os soro foram acondicionados em microtubos de polietileno de fundo cônico e congelados a -20º C até a realização do exame.

O diagnóstico sorológico da leptospirose foi realizado no Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), por meio da técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM), segundo o protocolo descrito de acordo com Brasil (1995). A SAM é considerada até hoje técnica padrão no diagnóstico da leptospirose animal e humana. Foi utilizado uma coleção de 12 antígenos vivos que incluram os sorovares Autumnalis, Australis, Bataviae, Bratislava, Canicola, Grippotyphosa, Hardjo, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Tarassovi e Wolffi, cultivados em meio líquido de Stuart (Dfico®), livre de contaminação e autoaglutinação. Foram considerados reagentes aqueles que apresentaram aglutinação na diluição igual a 1:100, de acordo com Brasil, (1995) e Magalhães (2006).

Para avaliação da relação frequência de leptospirose canina com as variáveis climáticas do município de Uberlândia, foram analisados os dados de temperatura, umidade relativa média do ar e precipitação pluviométrica. Estes dados fazem parte dos registros do Laboratório de Climatologia e Recursos Hídricos do Instituto de Geografia UFU, oriundos da Estação Climatológica da UFU (ECUFU), situada na região urbana do município (Tabela 1).

Tabela 1- Dados referentes ao microclima do município de Uberlândia, MG, 2008.

	Temperatura do ar			Umidade Relativa (%)				Precipitação (mm)	
Meses	Média Mensal	Max	Min	Média Mensal	Extremas Max	Extremas Min	Total Mensal	Max	Nº dias com chuva
Jan	23,4	27,8	19,7	79,0	98,0	33,0	252,5	48,9	21
Fev	23,2	28,2	19,1	79,0	97,0	50,0	264,8	33,0	23
Mar	23,0	27,8	19,2	79,0	97,0	50,0	244,6	45,5	19
Abr	22,9	27,9	18,7	77,0	98,0	48,0	262,2	59,5	14
Mai	20,5	26,1	15,6	71,0	96,0	39,0	80,8	52,3	4
Jun	20,9	26,5	15,9	67,0	90,0	35,0	9,0	7,1	3
Jul	20,2	26,9	14,2	55,0	84,0	25,0	0,0	0,0	0
Ago	23,3	29,7	17,0	54,0	84,0	20,0	0,5	0,5	1
Set	23,4	31,0	16,7	51,0	95,0	18,0	17,5	11,9	4
Out	24,6	29,8	19,9	61,0	94,0	26,0	148,2	38,0	9
Nov	23,7	29,1	19,4	72,0	89,0	39,0	59,9	10,3	14
Dez	23,3	28,2	19,5	76,0	97,0	30,0	363,3	81,0	17
Anual	22,7	28,3	17,9	68,0	93,0	34,0	1703,3	32,3	129

Fonte: Estação Climatológica do Laboratório de Climatologia e Recursos Hídricos do Instituto de Geografia Universidade Federal de Uberlândia, MG.

Os dados foram submetidos à análise estatística comparando-se as frequências de cães sororeagentes nos diferentes períodos relacionando-se com as variáveis climáticas registradas no município, por meio do teste de duas amostras independentes da binomial para duas proporções, com nível de significância de 5% (Ayres et al., 2007). Além do emprego da estatística descritiva com cálculo da média aritmética, valores máximos e mínimos e amplitude total.

Esta pesquisa atendeu às normas estabelecidas pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia, tendo parecer favorável para sua realização (Anexo 1).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 150 amostras de soro canino submetido à técnica de SAM no diagnóstico da leptospirose, 57 foram reagentes, determinando-se uma frequência de 38%. O sorovar mais frequente foi Autumnalis (15,79%), seguido de Bratislava e Canicola (14,03%); Tarassovi (10,53%); Pomona e Icterohaemorrhagiae (8,77%). Houveram também cães reagentes para os sorovares Grippotyphosa, Hardjo, Wolffi e Australis (Tabela 2).

Tabela 2 – Frequência dos principais sorovares de *Leptospira* spp. presentes na população canina reagente de Uberlândia, MG, 2008.

SOROVARES DE *Leptospira* spp.	**Nº DE CÃES REAGENTES**	%
Autumnalis	9	15,79
Bratislava	8	14,03
Canicola	8	14,03
Tarassovi	6	10,53
Pomona	5	8,77
Icterohaemorrhagiae	5	8,77
Grippotyphosa	4	7,02
Hardjo	3	5,26
Wolffi	2	3,53
Australis	1	1,75
Hardjo + Wolffi	2	3,53
Icterohaemorrhagiae + Hardjo + Wolffi	1	1,75
Icterohaemorrhagiae + Canicola	1	1,75
Icterohaemorrhagiae + Pomona	1	1,75
Icterohaemorrhagiae + Canicola + Pomona + Hardjo + Wolffi	1	1,75
TOTAL	57	100

Foram observados também casos de infecções mistas, coaglutinação em que em um mesmo animal reagiu a mais de um sorovar, podendo ser um indicativo de infecção por mais de um sorovar ou que possa haver reações cruzadas entre os sorovares de *Leptospira* spp.

A frequência de cães sororeagentes a *Leptospira* spp. foi de 38% sendo elevada ao ser comparada com os resultados de Boechar; Machado (2004), os quais concluíram que a leptospirose canina é endêmica em praticamente todas as regiões brasileiras, com uma média de 26% de cães reagentes no teste de SAM. A prevalência de leptospirose canina no país em sua maioria varia entre 13,1% e 27,3% (MAGALHÃES et al., 2006; AGUIAR et al., 2007).

Nesta pesquisa o sorovar Autumnalis (15,79%) foi o mais frequente, semelhante à pesquisa de Batista et al. (2004), em Patos, na Paraíba, os quais analisaram 130 amostras de soro canino e encontraram uma prevalência de 20%, com maior frequência dos sorovares Autumnalis (20%), Pomona (17,5%), Grippotyphosa (10%) e Patoc (10%). Segundo estes autores as sorovariedades predominantes relacionam-se com fatores ambientais e as possíveis espécies que coabitam com o cão.

A frequência expressiva do sorovar Autumnalis adverte para a importância no controle de roedores, uma vez que esses são os hospedeiros de manutenção deste sorovar, sendo as ratazanas as portadoras renais de lepstospiras no ambiente urbano (MASCOLLI et al., 2002). Pela urina eliminam o patógeno no ambiente que ao encontrar condições favoráveis, como o período chuvoso, se mantêm viáveis e podem contaminar outras espécies, como o cão e o ser humano.

Como o sorovar Autumnalis também foi descrito como um dos mais prevalentes em cães de diferentes regiões do Brasil (VIEGAS et al.,2001; BATISTA et al.,2004; AGUIAR et al.,2007), acredita-se que este sorovar tenha se adaptado a espécie canina.

A predominância do sorovar Autumnalis nesta pesquisa causa preocupação, pois, as vacinas comerciais existentes hoje no mercado não albergam este sorovar, sendo compostas basicamente pelos sorovares Icterohaemorrhagiae e Canicola. É importante destacar que não existe imunidade cruzada comprovada entre os sorovares heterólogos, fato que demonstra a importância da pesquisa continuada de

novas vacinas de leptospirose canina, com a inclusão de novas sorovariedades, visando uma cobertura vacinal mais efetiva e duradoura.

O mesmo sorovar também foi encontrado por Viegas et al. (2001) que investigaram 120 amostras de soro sanguíneo de cães errantes provenientes de vários Distritos Sanitários de Salvador, Bahia, obtendo-se 85% de reagentes positivos. Os sorotipos mais frequentes foram Autumnalis, Canicola, Icterohaemorrhagiae e Australis. Esta alta prevalência encontrada foi explicada pela população selecionada para o estudo ter sido composta de cães errantes que vivem permanentemente em vias públicas e dividem o mesmo espaço com os demais reservatórios, em terrenos baldios, lixões e viadutos.

Vale destacar que Vedhagiri et al. (2009) afirmaram que estão ocorrendo mudanças evolucionárias lentas com a origem de novos sorovares, estreitamente relacionados com outros que já existiam. Investigando as proteínas de membrana externa da *Leptospira* spp. verificaram que há similaridade entre sequências conservadas entre alguns sorovares de Leptospira interrogans, como Autumnalis e Grippotyphosa, que são relacionadas com a patogenicidade em mamíferos.

Essas afirmações enfatizam a idéia que o sorovar Autumnalis pode estar se adaptando a espécie canina ou reagindo de forma cruzada com o sorovar Grippotyphosa.

Em Curitiba, Paraná, Tesserolli et al. (2008) examinaram 598 amostras de soro sanguíneo de cães, sendo 193 (32,27%) reagentes para os sorovares Copenhageni (71,50%), Canicola (6,74%) e Icterohaemorrhagiae (2,08%). Diferente da soroprevalência encontrada nesta pesquisa e por Aguiar et al. (2007) que testaram 329 cães provenientes do município de Monte Negro, Rondônia, dos quais 156 eram da área urbana e 173 da área rural. Foram detectadas reações com títulos $\geq$100 em 27,3%, com 90 cães positivos ao agente, das quais 23,7% eram da área (37/156) urbana e 30,6% (53/173), da área rural ($p>0,05$). Os sorovares predominantes, reatores com títulos mais elevados, foram Autumnalis (22%), Pyrogenes (12%), Canicola (10%) e Shermani (7,5%).

A ocorrência de cães sororeagentes no período chuvoso deste estudo foi de 46,66%(35/75) e 29,33%(22/75) no período seco. Notou-se uma diferença

significativa ($p<0,05$) na ocorrência da leptospirose canina nos diferentes períodos avaliados, com maior frequência de cães reagentes no período chuvoso.

A maior frequência da doença no mês de março foi relacionada a maiores índices registrados de umidade relativa do ar, pluviosidade e temperatura. Tal fato pode ser explicado pela sobrevivência das leptospiras ser favorecida pela umidade, e temperaturas em torno de 28ºC, isolando-as em águas estagnadas com pH neutro, característicos das estações das chuvas em países tropicais.

O mesmo foi registrado por Ávila et al. (1998) que examinaram 425 cães provenientes da área de influência do Centro de Controle de Zoonoses de Pelotas, onde detectaram 148 amostras positivas, com maior ocorrência nos meses de temperaturas mais elevadas e maiores precipitações pluviométricas, incluindo o mês de março.

Magalhães et al. (2006) registraram maior percentual de cães sororeagentes nos meses de janeiro e dezembro, período de maior precipitação pluvial e temperaturas médias mais elevadas.

A sazonalidade da leptospirose canina e sua associação com a precipitação pluviométrica também foi pesquisada por Ward (2002) em estudo realizado nos Estados Unidos e Canadá. Neste estudo verificou-se que houve um maior número de casos registrados entre no final do verão e início do outono, período com maiores índices pluviométricos. Okewole; Ayoola (2009) determinaram uma correlação positiva do número de casos de leptospirose canina registrados no sudoeste da Nigéria com áreas litorâneas com elevados índices de precipitação pluviométrica. O mesmo foi registrado no presente estudo.

Adin; Cowgill (2000) afirmaram que a precipitação pluviométrica pode ser útil na previsão do número de casos de leptospirose canina e verificaram uma correlação positiva de 71% entre o número de casos anuais da doença nos cães e a quantidade anual de chuvas, comprovando desta forma a importância da sazonalidade na ocorrência da leptospirose nos cães. Ward (2002) concluiu que a leptospirose canina além de ter distribuição sazonal pode ocorrer em períodos de precipitações pluviométricas elevados superiores a três meses.

Mascolli et al. (2002) não encontraram correlação significativa entre a ocorrência da leptospirose canina com a presença de ratos, ocorrência de enchentes

e índices pluviométricos. Para Ávila-Pires (2006) o aumento de casos de leptospirose em seres humanos relacionados aos períodos de maiores índices de precipitação pluviométrica, acompanhados de enchentes, pode estar na verdade relacionados com aumento de notificação de casos, exames solicitados e mortalidade neste período.

O período chuvoso em Uberlândia, MG, no ano de 2008 foi marcado por temperatura média de 22,71ºC (±1,10), umidade relativa do ar média de 66,68% (±25,45) e precipitação pluviométrica média de 244,7mm (±91,32), enquanto que, o período seco apresentou 22,68ºC (±1,72), 60,0% (±8,19) e 39,18mm (±57,83), respectivamente. O mês de dezembro apresentou uma maior precipitação pluviométrica, enquanto que Julho demonstrou uma escassez de chuva, sem registro de precipitação (Tabela 2).

A maior detecção de aglutininas anti-*Leptospira* spp. foi registrada no mês de março com 22 cães reagentes e o menor índice em maio, fim do período chuvoso, com apenas um cão sororeagente. A maior incidência em março está relacionada com registros elevados de umidade relativa do ar, altos índices pluviométricos e de temperatura que ocorreram neste período. Enquanto que, no mês de maio notou-se queda nas variáveis climáticas analisadas, que se mantiveram mais baixas durante todo período seco quando comparados à época das chuvas, no ano analisado.

A precipitação máxima em 24 horas em média no período chuvoso foi de 53,36mm de água (±16,11), apresentando aproximadamente 17 dias por mês com chuva. Já o período seco, apresentou 11,3mm (±13,97) de precipitação máxima em 24 horas e em média apenas seis dias chuvosos durante um mês.

A estação do ano foi fator importante na ocorrência da Leptospirose, pois temperaturas amenas próximas de 28ºC, com umidade relativa do ar elevada favorecem a manutenção do agente no meio. Em épocas de alta precipitação pluviométrica associadas à ineficiência dos sistemas de drenagem facilitam o contato agente-hospedeiro, caracterizando-se pelas águas superficiais estarem contaminadas com *Leptospira* spp. eliminada da urina principalmente de ratos, propiciando o contato com espécies susceptíveis.

De acordo com Ward (2002), ao se evitar a exposição de cães a locais recentemente inundados ou águas que possam estar contaminadas com os

sorovares de Leptospira, pode efetivamente reduzir a ocorrência da doença. A previsão de períodos chuvosos pode desencadear maiores esforços para conscientização do risco sazonal da leptospirose e possível exposição dos animais de estimação, promovendo a imunoprofilaxia antes de uma temporada chuvosa.

Historicamente essa maior ocorrência no período chuvoso é previsível, portanto, medidas de controle e profilaxia da leptospirose em cães devem ser intensificadas em períodos que antecedam o início das chuvas.

CONCLUSÃO

A ocorrência da leptospirose em cães no município de Uberlândia foi de 38%. Houve diferença significante na ocorrência de leptospirose em cães avaliados nos diferentes períodos do ano, com maior frequência de cães reagentes no período chuvoso. Os sorovares mais frequentes foram o Autumnalis (15,79%) seguido por Bratislava e Canicola (14,03%); Tarassovi (10,53%); Pomona e Icterohaemorrhagiae (8,77%).

REFERÊNCIAS

ACHA, P.N; SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. **Organización panamericana de la Salude**, 3 ed. Washington, p. 112-120, 2003.

ADIN, C.A., COWGILL, L.D. Treatment and outcome of dogs with leptospirosis: 36 cases (1990–1998). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.216, n.3, p.371–375, 2000. Disponível em http://avmajournals.avma.org/toc/javma/216/3. Acesso em: 15 jan. 2008.

ADLER, B.; MOCTEZUMA, A.P. *Leptospira* and Leptospirosis. **Veterinary Microbilogy**, Amsterdam, v.140, n.3/4, p.287-296, 2010. Disponível em: <doi:10.1016/j.vetmic.2009.03.012>. Acesso em: 12 jan. 2010.

AGUIAR, D.M.; CAVALCANTE, G.T.; MARVULO, M.F.V.; SILVA, J.C.R.; PINTER, A.; VANCONCELLOS, S.A.; MORAIS, Z.M.; LABRUNA, M.B.; CAMARGO, L.M.A.; GENNARI, S.M. 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,** Belo Horizonte**,** v.59, n.1, p.70-76, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010209352007000100012&script=sci_arttext&tlng=e>. Acesso em: 22 mar. 2008. doi: 10.1590/S0102-09352007000100012

ÁVILA, 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 no Ano de 1995. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.28, n.1, p.107-110, 1998. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/cr/v28n1/a18v28n1.pdf. Acesso em: 23 jul. 2008.

AVILA-PIRES, F.D. Leptospirose e enchentes: Uma falsa correlação? **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v.35, n.3, p.199-204, 2006. Disponível em:<

http://www.revistas.ufg.br/index.php/iptsp/article/viewPDFInterstitial/1880/1793>. Acesso em: 23 jul.2008.

AYRES M., AYRES JR. M., AYRES D.L., SANTOS, A.A.S. **Bioestat 5.0**: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. 6.ed. Belém, 2007.

BATISTA, C.S.A; AZEVEDO, S.S.; ALVES, C.J.; VASCONCELLOS, S.A.; MORAIS, M.; CLEMENTINO, I.J.; LIMA, F.S.; ARAUJO NETO, J.O. Soroprevalência de leptospirose em cães errantes da cidade de Patos, Estado da Paraíba, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.41, n.2, p.131-136, 2004. Disponível em: < http://www.scielo.br/pdf/bjvras/v41n2/25230.pdf>. Acesso em: 14 nov.2008.

BOECHAR, J.U.D; MACHADO, P.J. Prevalência da leptospirose canina no Brasil. **Revista Veterinária SER**, v. 1, n1, p.40-47, 2004.

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

BRITO, J.; PRUDENTE, T.D. Mapeamento do uso da terra e cobertura vegetal do município de Uberlândia-MG, utilizando imagens ccd/cbers2. **Caminhos da Geografia**, Uberlândia, v.13, n.15, p. 144-153, 2005. Disponível em: < http://www.ig.ufu.br/revista/volume15/artigo13_vol15.pdf>. Acesso em: 11 jul. 2008.

FAINE, S ; ADLER. B.; BOLIN,C.; PEROLAT, P. **Leptospira and leptospirosis**. 2. ed. Melbourne: MedSci, 1999. 272 p.

JOUGLARD, S.D.D.; BROD, C.S. Leptospirose em cães: Prevalência e fatores de risco no meio rural do município de Pelotas, RS. **Arquivo do Instituto Biológico**,

São Paulo, v.67, n.2, p.181-185, 2000. Disponível em: < http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V67_2/7.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2008.

LEVETT, P.N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.14, n.2, p.296-326, 2001. Disponível em: < http://cmr.asm.org/cgi/content/full/14/2/296 >. Acesso em: 14 jul.2008.

MAGALHÃES, D.F.; SILVA, J.A.; MOREIRA, E.C.; WILKE, V.M.L.; HADDAD, J.P.A.; MENESES, J.N.C. Prevalência de aglutininas anti-*Leptospira interrogans* em cães de Belo Horizonte, Minas Gerais, 2001 a 2002. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 2, p. 167-174, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v58n2/29657.pdf>. Acesso em: 14 ago. 2008.

MASCOLLI, R.; PINHEIRO, S.R.; VASCONCELLOS, S.A; FERREIRA, F.; MORAIS, Z.M.; PINTO, C.O.; SUCUPIRA, M.C.A; DIAS, R.A.; MIRAGLIA, F.; CORTEZ, A.; SILVEIRA DA COSTA, S.; TABATA, R.; MARCONDES, A.G. Inquérito sorológico para leptospirose em cães do município de Santana de Paraíba, São Paulo, utilizando a campanha de vacinação anti-rábica do ano de 1999. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.69, n.2, p.25-32, 2002. Disponível em: < http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V69_2/mascolli.pdf>. Acesso em: 14 ago. 2008.

MINKE, J.M.; BEY, R.; TRONEL, J.P.; LATOUR, S.; COLOMBERT, G.; YVOREL, J.; CARIOU, C.; GUIOT, A.L.; COZETTE, V.; GUIGAL, P.M. Onset and duration of protection immunity against clinical disease and renal carriage in dogs provided bi-valent inactivated Leptospirosis vaccine. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.137, n.1-2, p.137-145, 2009. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19179023 >. Acesso em: 20 out. 2009.

OKEWOLE, E.A.; AYOOLA, M.O. Seroprevalence of leptospiral serovars other that Canicola and Icterohaemorrhagiae in dogs in the Southwestern Nigeria. **Veterinarski Arhiv**, Iugoslavia, v.79, n.1, p.87-96, 2009. Disponível em <http://hrcak.srce.hr/file/52785.>. Acesso em: 15 nov. 2009.

OLIVEIRA, S.J.; PIRES NETO, J.A.S. Aspectos etiológicos e diagnóstico nas leptospiroses. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, Brasília, v.10, p.36-46, 2004.

TESSEROLLI GL, ALBERTI JVA, BERGAMASHI C, FAYZANO L, AGOTTANI JVB. Principais sorovares de leptospirose canina em Curitiba, Paraná. **Pubvet**, Londrina, v.2, n.21, 2008. Disponível em: < http://www.pubvet.com.br/artigos_det.asp?artigo=78 >. Acesso em: 15 ago.2008.

THIERMANN, A.B. Leptospirosis: Current developments and trends. **Journal American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 184, n. 6, p. 722-5, 1984.

VEDHAGIRI, K., NATARAJASEENIVASAN, K., CHELLAPANDI, P., PRABHAKARAN, S.G., JOSEPH SELVIN, SHARMA, S., VIJAYACHARI, P. Evolutionary Implication of Outer Membrane Lipoprotein-Encoding Genes ompL1, lipL32 and lipL41 of Pathogenic Leptospira Species. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, USA, v.7, n.3, p. 96-106, 2009. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/journal/16720229 >. Acesso em: 20 set. 2009.

VIEGAS, S.A.R.A.; TAVARES, C.H.T.; OLIVEIRA, E.M.; DIAS, A.R; MENDONÇA, F.F.; SANTOS, M.F.D. Investigação sorológica para leptospirose em cães errantes na cidade de Salvador – Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v.2, n.1, p.21-30, 2001. Disponível em:<http://www.rbspa.ufba.br/index.php/rbspa/article/view/603/335>. Acesso em: 15 mai 2008.

WARD, M.P. Seasonality of canine leptospirosis in the United States and Canada and its association with rainfall. **Preventive Veterinary Medicine**, Inglaterra, v. 56, n.3, p.203–213, 2002. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/journal/01675877>. Acesso em: 20 set. 2009.

CAPÍTULO 4 – CINÉTICA DA RESPOSTA IMUME HUMORAL DE CÃES JOVENS IMUNIZADOS CONTRA *Leptospira interrogans*

RESUMO – Objetivou-se analisar a resposta imune humoral contra *Leptospira interrogans* mediante a utilização da prova de Soroaglutinação Microscópica (SAM) em 26 cães jovens, sendo 17 de raça definida (Grupo A) e nove sem raça (Grupo B), de ambos os sexos, pertencentes a canis e ambientes domiciliares em Uberlândia, Minas Gerais. Os animais foram vacinados com bacterina inativada comercial polivalente albergando os sorovares Canicola, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae e Pomona. O esquema vacinal baseou-se em três imunizações. A primovacinação foi realizada aos quarenta e cinco dias de idade, considerado dia zero, e após dois reforços com intervalos de trinta dias cada. Sete colheitas sanguíneas de cada animal foram efetuadas do dia zero até aos 180 dias pós-vacinais, com intervalos de trinta dias cada. Não foram detectados títulos pré-vacinais para os sorovares Canicola, Icterohaemorrhagiae e Grippotyphosa no dia zero. Apenas um cão do grupo A foi reagente com título 1:100 contra o sorovar Pomona na primeira colheita. Não houve diferença estatística entre os títulos de anticorpos aglutinantes entre os Grupos A e B ($p>0,05$), induzidos pela bacterina comercial utilizada, exceto na colheita II ($p<0,05$), na qual o grupo B apresentou títulos para o sorovar Autumnalis em todos os cães avaliados, enquanto que, no grupo A, 64,7% dos cães não foram reagentes a nenhum sorovar testado. Verificaram-se no dia 30, títulos para o sorovar Autumnalis que persistiram até os 180 dias pós-vacinais, em ambos os grupos, variando apenas a intensidade da resposta imunológica sem diferença estatística significativa. Para avaliação da eficiência vacinal da bacterina anti-*Leptospira* a presente pesquisa alerta para os ricos à infecção que os cães vacinados anualmente estão submetidos.

Palavras-chave: Cães, Leptospirose, vacinação.

.

CHAPTER 4 – KINETICS OF THE HUMORAL IMMUNE RESPONSE OF DOGS YOUNG IMMUNIZED WITH *Leptospira interrogans*

ABSTRACT – The objective was to analyze the humoral immune response against Leptospira interrogans using the microscopic agglutination test (MAT) in 26 young dogs, and 17 mixed breed (Group A) and nine mixed breed (Group B) of both sexes, pertaining to kennels and home environments in Uberlandia, Minas Gerais. The animals were vaccinated with commercial inactivated polyvalent bacterin serovars harboring Canicola, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae and Pomona. The immunization schedule was based on three immunizations. The first vaccination was performed at forty-five days of age, considered day zero, and after two boosters at intervals of thirty days each. Seven blood samples from each animal were made from time zero up to 180 days post-vaccination, at intervals of thirty days each. Titles have not been detected pre-vaccination against serovars Canicola, and Icterohaemorrhagiae Grippotyphosa on day zero. Only one dog in group A was reactive with a titer of 1:100 against Pomona in the first harvest. There was no statistical difference between the agglutinating titers between Groups A and B ($p > 0.05$) induced by commercial vaccine used, except at harvest II ($p < 0.05$), in which the group B presented evidence to serovar Autumnalis in all dogs evaluated, whereas in group A, 64.7% of dogs were not reactive to any serovar tested. There were on the 30th title to serovar Autumnalis that persisted until 180 days post-vaccination in both groups, varying only the intensity of immune response without significant statistical difference. To assess the efficiency of vaccine culture anti-Leptospira this research to warn the rich infection that dogs are vaccinated annually submitted.

Keywords: Dogs, Leptospirosis, vaccination.

INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença cosmopolita de ocorrência endêmica no Brasil (BOECHAT; MACHADO, 2004) e caracteriza-se por incluir-se nas doenças de notificação compulsória (BRASIL, 1995). A epidemiologia e a incidência desta zoonose urbana se favorecem pelas condições encontradas em grandes centros, os quais apresentam elevadas populações caninas e de roedores, além de estarem cercados por bolsões periurbanos de pobreza, favorecendo a disseminação e a manutenção do agente infeccioso de maneira permanente (JASZCZERSKI, 2005).

É uma zoonose de elevada prevalência entre os animais domésticos, silvestres e nos humanos. As diferentes espécies podem ser susceptíveis ou portadores assintomáticos, tendo desta forma um hospedeiro reservatório infectado, o qual libera a bactéria no ambiente por meio da leptospiúria permanente ou transitória (LANGONI et al., 2002).

Os cães ao nascerem possuem o sistema imune completamente desenvolvido, porém o completo desenvolvimento da capacidade de realizar respostas imunes eficientes dependerá da estimulação antigênica. A imunidade nas primeiras semanas de vida dos filhotes de cães ocorre por meio da ingestão de anticorpos presentes no colostro materno nas primeiras horas de vida (TIZARD, 2002).

A imunidade passiva ocorre principalmente pela ingestão do colostro devido a placenta nesta espécie ser do tipo endoteliocorial que permite somente a passagem de pequena quantidade de anticorpos IgG no ambiente uterino (TIZARD, 2002; DAY, 2007). A vacinação deve ser realizada quando no período de redução dos anticorpos maternais, para haver a produção de anticorpos endógenos e resposta adequada frente ao desafio vacinal. Faz-se necessário no mínimo, dois reforços para ativação da memória imune duradoura (HORZINEK, 2010).

Cães filhotes mesmo vacinados podem se infectar por agentes mesmo contidos na vacina, devido condições inerentes ao agente exposto, ambiente e ao hospedeiro. Neste contexto, destaca-se o período ideal para iniciar a imunização nos filhotes sendo um assunto controverso, pois acredita-se que, a vacinação aos 45 dias de idade caracterize por queda considerável dos anticorpos neutralizantes

maternos com resposta adequada do filhote imunizado. Comumente há emprego de imunógenos polivalentes constituídos de agentes virais e bacterianos concomitantemente. De acordo com Schultz et al. (2010), o tempo viável de anticorpos contra cada agente poderá ser variável, a imunidade adaptativa para bactérias, fungos e parasitas se mostram geralmente menor quando comparada a duração da resposta imune em infecções virais sistêmicas e os anticorpos maternais poderão perdurar acima de 45 dias e interferirem de modo considerável na resposta imune do filhote.

Monteiro (2003) afirmou que a imunidade na leptospirose é predominantemente humoral e que as imunoglobulinas são produzidas de dois a dez dias pós-infecção dependendo da espécie, imunidade do hospedeiro e sorovar infectante. A resposta imune humoral frente à exposição ao agente é demonstrada por testes sorológicos com uma maior atividade de anticorpos da classe IgG e IgM, após infecção natural ou imunização (MARINHO, 2008).

No entanto, Marinho et al. (2003) demonstraram que os anticorpos aderem às lipoproteínas de membranas (lipopolissacarídeo – LPS) das leptospiras, num processo de opsonização, preparando-as para serem fagocitadas pelas células reticuloendoteliais. Estes autores concluíram que não somente a resposta humoral é importante para a contenção do processo infeccioso, mas também a resposta imune celular, pela produção de citocinas e atividade macrofágica. Isto foi demonstrado em experimento realizado com camundongos geneticamente selecionados para bons e maus produtores de anticorpos, frente à infecção por *Leptospira interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae.

Abdulkader et al. (2002) observaram que a sintomatologia aparece na fase aguda da doença em pacientes humanos, principalmente sinais renais e hepáticos, quando os anticorpos específicos começam a ser detectadas em exames sorológicos. Acredita-se que os complexos imunes circulantes estejam relacionados com a severidade dos sinais clínicos.

A resposta imune é variável em função do tipo e qualidade da vacina e fatores inerentes ao animal. A resposta as leptospiras assemelha-se a resposta desencadeada pelas bactérias Gram-negativas, porém com menor atividade

endotóxica (FAINE, 1999), e alta imunogenicidade. Os LPS de membrana externa apresentam importante função imunogênica (MONTEIRO, 2003).

Ao descreverem as vacinas que são utilizadas nos animais, Faine et al. (1999) citaram que estas são utilizadas para proteger os animais e humanos de contrair a leptospirose. As vacinas para bovinos e suínos têm sido testadas por vários anos e seus resultados conflitam nos relatos de sua eficácia. Os autores relatam exemplos de baixa ou quase nenhuma resposta sorológica, após imunização com vacinas comerciais (ARDUINO et al., 2004).

Para cães, as bacterinas antileptospíricas devem conter os principais sorovares que acometem esta espécie, numa dada região geográfica. Para Langoni et al. (2002) as bacterianas induzem a proteção contra a doença clínica e, nem sempre, protegem do estado de portador renal, com imunidade menos efetiva em comparação a obtida por agentes virais. Três a quatro doses com intervalo de duas a três semanas, seriam necessários para conferir proteção por seis a oito meses apenas. Para Schreiber et al. (2005) a vacinação protege apenas contra a sintomatologia clinica e o estado de portador renal. E Minke et al. (2009) ainda ressaltaram a prevenção da transmissão da zoonose para o ser humano.

Em estudo retrospectivo das bacterinas comercias contra Leptospira atualmente disponíveis, Srivastava (2006) e Wang et al. (2007) classificaram-nas em vacinas celulares e acelulares. Sendo as celulares compostas de leptospiras inativadas e atenuadas, e acelulares constituídas por proteínas recombinantes, lipoproteínas e DNA.

As frações da Leptospira nas bacterinas para cães comercializadas no Brasil geralmente são preparadas a partir de componentes de membrana externa, por meio da tecnologia OMC (Outer Membrane Complex), na qual são extraídos antígenos imunogênicos da membrana externa da bactéria. Fundamentado no fato que as bactérias são as principais responsáveis pelas reações pós-vacinais, as bacterinas atuais ao invés de utilizarem todo microrganismo, usam apenas as proteínas imunogênicas do envoltório, conferindo maior seguridade (RIBEIRO et al., 2003).

Os principais sorovares encontrados nas vacinas comerciais são o Icterohaemorrhagiae e Canicola. Em cães, os sinais clínicos da leptospirose

atribuem-se a infecções comumente causadas pelos sorovares Canicola, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa, Pomona e Bratislava. O sorovar Autumnalis vem sendo associado a novos casos clínicos da doença canina (GREENE et al., 2006).

Faine et al. (1999) descreveram a importância da identificação da variante sorológica da leptospira, uma vez que, a imunidade conferida é sorovar específica, não havendo imunidade cruzada. O fato da resposta imunológica ter baixa intensidade e específica para cada sorovar, faz de algumas vacinas comerciais uma medida profilática muitas vezes ineficiente.

A dose protetora vacinal tem forte correlação com o título de anticorpos gerados pela imunização (BRASIL,1995) e que há efetividade com títulos a partir de 1:100 (ALMEIDA et al.,1994).

Gueguen et al. (2000) e Klaasen et al. (2003) afirmaram que os cães imunizados apresentam-se reagentes com resposta duradoura de um ano frente a desafios pós-vacinais. Outros pesquisadores acreditam que cães recém vacinados apresentam títulos sorológicos de até 1:400 (ÁVILA et al., 1998). Maele et al.(2008) encontraram cães com títulos de até 1:800, por um período pós-vacinal de até quatro meses. Por outro lado, há registros de pesquisadores que se contrapõem a essas afirmativas, e relatam que cães após serem imunizados podem não ser reagentes ao Teste de Soroaglutinação Microscópica (BARR et al., 2005, TEIXEIRA et al., 2008).

A leptospirose é uma doença complexa e, embora as vacinas sejam amplamente disponíveis há controvérsias quanto à eficácia da proteção conferida em cães (ANDRÉ-FONTAINE, 2006).

Por ser uma doença endêmica no Brasil, e haver uma diversidade de sorovares e resposta imune, estudos sobre imunoprofilaxia desta doença nos cães se tornam necessários.

Esse estudo foi proposto com o objetivo de avaliar a cinética da resposta imune humoral pós-vacinal em cães jovens de diferentes raças, pela detecção de títulos de anticorpos contra Leptospira, após imunizações com uma bacterina comercial.

MATERIAL E MÉTODOS

Local

A pesquisa foi realizada no período de 2008 a 2009, em cães pertencentes a canis e ambientes domiciliares de Uberlândia, Minas Gerais.

Animais

O experimento foi conduzido após aprovação do Comitê de Ética na Utilização de animais (Anexo 2) e prévia autorização dos proprietários dos cães incluídos na pesquisa (Apêndice D).

Foram avaliados 26 cães filhotes, selecionados aleatoriamente, com data de nascimento e previsão de acompanhamento durante o período da pesquisa. Os cães selecionados foram cadastrados em fichas de identificação com informações referentes ao proprietário, animal e ambiente em que viviam (Apêndice C). Os animais foram identificados por características individuais e acompanhados até o final do experimento.

O manejo nutricional e sanitário não sofreu padronização preservando-o em particular a cada criador, uma vez que, a pesquisa foi realizada *in situ*. Os cães foram avaliados em situação natural, recebendo diretamente as variações do ambiente.

Os cães foram acompanhados dos 45 aos 225 dias de idade, por visitas mensais e avaliação clínica certificando-se que os mesmos apresentavam-se hígidos durante todo o experimento.

Para a pesquisa, os cães de ambos os sexos foram divididos em Grupos A e B, sendo 17 com raça definida (Grupo A) e nove sem raça definida (Grupo B). O Grupo A foi composto por quatro cães da raça rottweiler, cinco cockers, dois beagles, um teckel e cinco pit bulls.

Vacinação

Foi utilizado como imunógeno uma bacterina inativada comercial contendo os sorovares Canicola, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae e Pomona, liofilizada, contendo adjuvante e cepas virais atenuadas contra Hepatite Infecciosa Canina, Adenovírus Canino Tipo 2, Cinomose, Parinfluenza, Parvovirose e Coronavirose.

O protocolo vacinal foi composto por três imunizações, no dia zero (aos 45 dias de idade), no dia trinta (75 dias de idade) e no dia sessenta (aos 105 dias de idade). No dia da imunização cada cão recebeu uma dose de 1 mL por via subcutânea, assepticamente conforme as recomendações do fabricante. As vacinas foram acondicionadas e mantidas sob refrigeração (2-8ºC) até o momento da aplicação.

Colheitas de sangue

Sete colheitas de sangue de cada animal foram efetuadas, sendo as três primeiras previamente a cada imunização. Este procedimento foi realizado nos dias 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180, conforme Figura 1.

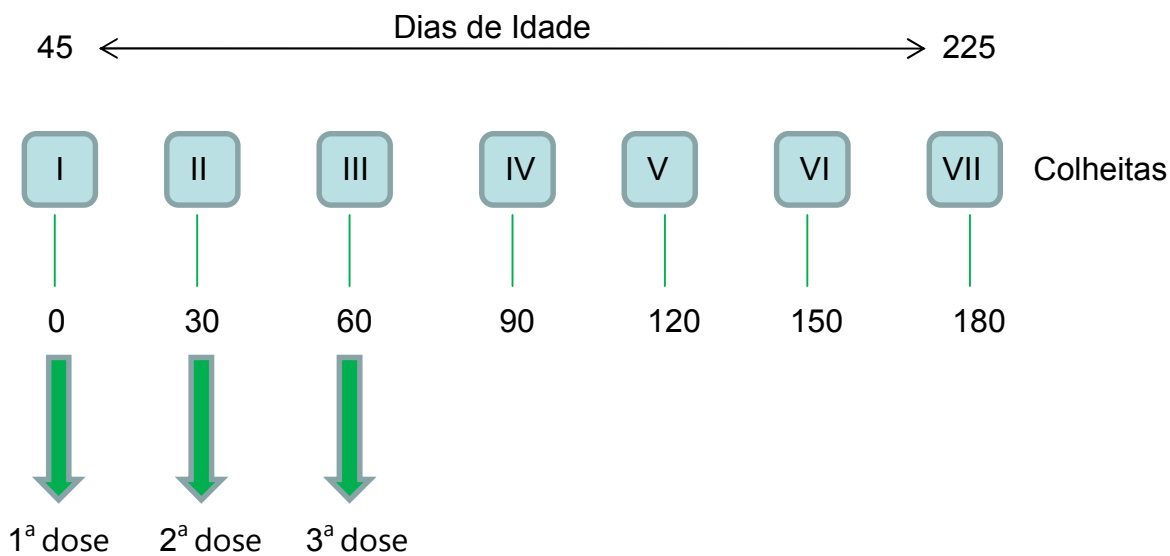


Figura 1 - Esquema do protocolo vacinal e de colheita de sangue executado na presente pesquisa.

Para colheita de sangue, a veia de escolha variou de acordo com a idade e massa corporal dos cães. Filhotes na primeira e segunda colheita e raças de pequeno porte a venopunção foi procedida na veia jugular, enquanto que, a partir da terceira colheita e raças de médio e grande porte na veia cefálica acessória. A venopunção foi feita por meio de seringas descartáveis e agulhas calibre 25x7, em volume de 5mL de sangue de cada cão, em tubos estéries a vácuo com gel separador de soro, após anti-sepsia com álcool.

As amostras foram mantidas refrigeradas (2 a 8ºC) em caixa isotérmica. O material foi transportado ao Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (FAMEV-UFU) e centrifugado a 2.500 rpm, durante cinco minutos. Em seguida, as amostras de soro foram acondicionadas em microtubos de polietileno de fundo cônico e congeladas a -20º C até a realização do exame.

Exame Sorológico

As análises sorológicas para leptospirose foram processadas conforme Brasil (1995) e Magalhães et al. (2006) e, por meio do Teste de Soroaglutinação Microscópica (SAM) em campo escuro padronizado pelo Ministério da Saúde. Foi utilizada uma coleção de 11 antígenos vivos que incluíram os sorovares Autumnalis, Bataviae, Bratislava, Canicola, Grippotyphosa, Hardjo, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Tarassovi e Wolffi. Os antígenos foram preparados a partir de matrizes mantidas no laboratório de Doenças Infecctocontagiosas da UFU, repicadas semanalmente em meio de cultura EMJH (Difco®), enriquecido com 10% de soro de coelho, mantido em estufa a 30ºC e utilizados próximo ao terceiro dia de incubação, livre de contaminação e de auto-aglutinação.

Durante a leitura avaliou-se o grau de aglutinação, segundo o Centro Panamericano de Zoonoses (1985) e o Ministério da Saúde do Brasil (BRASIL, 1995). Foram consideradas reagentes as amostras de soro sanguíneo que aglutinaram pelo menos 50% das leptospiras na diluição de 1:100. Em seguida as amostras reagentes foram tituladas até 1:6400, diluídas na proporção geométrica de

razão dois. Foi considerada como título final a maior diluição que apresentou pelo menos 50% de leptospiras aglutinadas no campo microscópico.

Análise estatística

Nesta pesquisa foi utilizada a análise estatística não-paramétrica com a execução do programa Bioestati 5.0, conforme Ayres et al. (2007).

A avaliação dos títulos sorológicos e comparação entre os grupos A e B foi feita pelo teste de Mann-Whitney para amostras independentes, e pelo teste de Friedman a comparação das respostas vacinais entre cães de um mesmo grupo (α=0,05).

As demais correlações dos cães reagentes, que apresentaram títulos somente contra os sorovares contidos na vacina, com as variáveis sexo, raça, tipo de alimentação, vacinação dos pais, presença de contactantes, roedores e acesso a rua empregou-se o teste *Odds ratio*, com nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nenhum animal apresentou reação macroscópica pós-vacinal na inspeção clínica ou relatada pelo proprietário. Ratificando Barr et al. (2005) que afirmaram que mais de 99% dos cães vacinados com bacterinas contra *Leptospira* se encontram livres de reações vacinais. Tal fato pode ser explicado pela tecnologia empregada nas vacinas atuais em que utilizam apenas porções mais imunogênicas dos antígenos, com maior seguridade quanto reações pós-vacinais. A vacina empregada na presente pesquisa utilizou apenas a membrana externa da *Leptospira interrogans* que contém os principais antígenos imunogênicos da bactéria.

Um dos principais inconvenientes da vacinação dos neonatos é a presença de anticorpos neutralizantes maternos que impedem uma melhor resposta imune efetiva. Desta forma, os cães receberam a primeira vacinação aos 45 dias de vida, período este em que ocorre um decréscimo dos anticorpos maternos recebidos via colostral (DAY, 2007; HORZINEK, 2010). No presente experimento 100% dos filhotes ingeriram colostro, por esta razão ingestão de colostro não foi considerada variável de comparação estatística.

Nas pesquisas sobre eficácia de vacinas geralmente utilizam em suas respectivas metodologias grupos controlados quanto a alimentação e manejo, fixando o máximo de variáveis possíveis. No entanto, acredita-se que estas podem não estar correlacionando com o verdadeiro desafio vacinal e natural que os cães sofrem *in situ*, nos locais em que vivem, com manejo e alimentação variadas. Em proposta de novas metodologias de pesquisa científica Lovatto et al. (2007) discutiram a importância de se considerar a heterogeinicidade entre os estudos, a melhor representatividade da aplicação prática do tratamento e que em muitas vezes, os cuidados experimentais distanciam a amostra experimental da realidade do conjunto da população.

Os títulos de anticorpos produzidos pelos cães dos Grupos A (Figura 2) e B (Figura 3) após imunização foram expressos em logaritmo na base 10, assim como nas pesquisas de Marinho et al (2003), Barr et al. (2005) e Arduino et al. (2009).

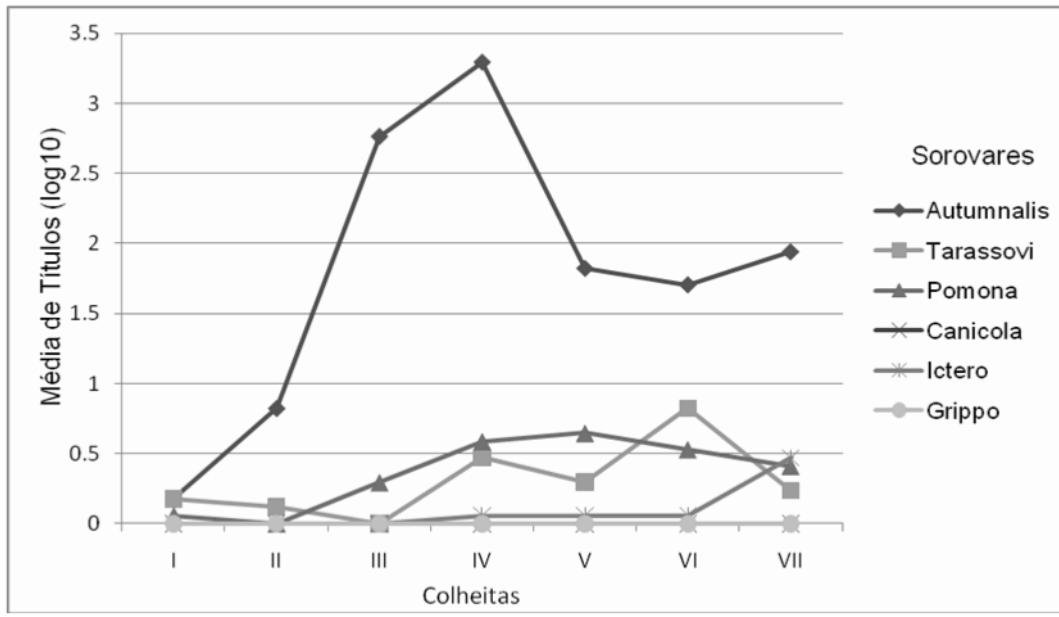


Figura 2- Médias dos logaritmos dos títulos de anticorpos detectados pela SAM para diferentes sorovares, em cães filhotes do Grupo A (com raça definida) vacinados contra *Leptospira interrogans* sorovares Canicola, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa e Pomona.

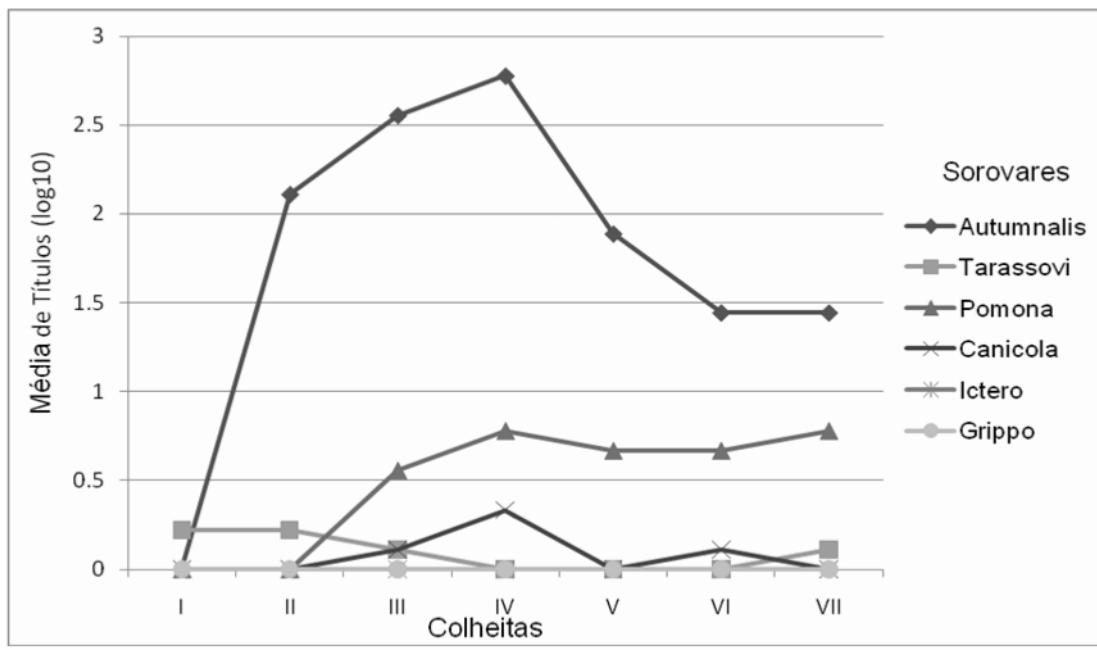


Figura 3- Médias dos logaritmos dos títulos de anticorpos detectados pela SAM para diferentes sorovares, em cães filhotes do Grupo B (sem raça definida) vacinados contra *Leptospira interrogans* sorovares Canicola, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa e Pomona.

Nenhum cão da pesquisa apresentou títulos (≥100) contra o sorovar Grippotyphosa durante toda pesquisa, assim como no estudo de Langoni et al. (2002) os quais não obtiveram valores importantes na resposta imune dos cães avaliados para este sorovar contido na bacterina utilizada. Não há relatos que justifique ausência de título pós-vacinal, por esta razão aventa-se a possibilidade do sorovar Grippotyphosa não ser um bom imunógeno.

Não foram detectados títulos pré-vacinais (≥100) para os sorovares Canicola, Icterohaemorrhagiae e Grippotyphosa no dia zero, durante a primeira colheita em ambos os grupos. Isso confirmou que 82,35% não foram reagentes para nenhum sorovar inicialmente. Entretanto, no Grupo A um cão (5,88%) apresentou títulos pré-vacinais contra os sorovares Autumnalis (1:400) e Pomona (1:100) e outros dois cães (11,77%) apresentaram anticorpos contra o sorovar Tarassovi (1:100 e 1:200).

No dia zero, durante a primeira colheita no Grupo B não foram detectados títulos pré-vacinais (≥100) em 77,77% dos cães contra os sorovares Canicola, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa, Pomona e Autumnalis. No entanto, dois cães (22,23%) se mostraram reagentes (1:100) frente ao sorovar Tarassovi na primeira colheita.

Autumnalis e Tarassovi não são constituintes de nenhuma bacterina comercial disponível para cães (GREENE et al., 2006), por não serem historicamente sorovares comuns para esta espécie.

O fato de alguns cães em ambos os grupos já apresentarem títulos a alguns sorovares no dia zero podem estar relacionados com anticorpos maternos advindos do colostro que nesta fase já deveriam ter declinado completamente caracterizando a janela imunológica que o filhote passa antes da primo-vacinação, ou ainda, poderiam estar relacionados a exposição prévia ao agente e possível infecção pelos sorovares em questão. A detecção precoce de IgG e IgM de acordo com Abdulkader et al. (2002) é indicador geral de reinfecção de varias doenças infecciosas, assim como a leptospirose.

Em pesquisa semelhante em que foi avaliado a cinética da resposta imune humoral de beagles adultos frente a um esquema vacinal de duas doses contra os mesmos sorovares da presente pesquisa, Jaszczerski (2005) identificou títulos pré-vacinais variando entre 1:25 e 1:100 contra o sorovar Copenhageni e a partir de

dados referentes a imunizações anteriores comprovou que os cães nunca foram imunizados contra este sorovar e que possivelmente estes animais sofreram infecção subclínica prévia.

O contato prévio com o sorovares Tarassovi e Autumnalis detectado pelos títulos pré-vacinais observados no dia 0, segundo Jaszczerski (2005) pode ter induzido a formação de um clone de memória para proteínas de membrana celular reconhecidas como proteínas comuns. Técnicas extremamente sensíveis, como Western Blotting, demonstraram que o sistema imune de cães vacinados com determinados sorogrupos, respondem a infecções provocadas por outros sorovares similares ou distintos, promovendo uma rápida e intensa resposta secundária do tipo booster ao antígeno comum predominante de ambos sorovares. O clone de memória com maior avidez às proteínas antigênicas do sorovar que pode ter provocado infecção e, não àqueles que compõem a vacina inativada, justificando desta forma a baixa intensidade dos títulos pós vacinais dos sorovares contidos na vacina utilizada.

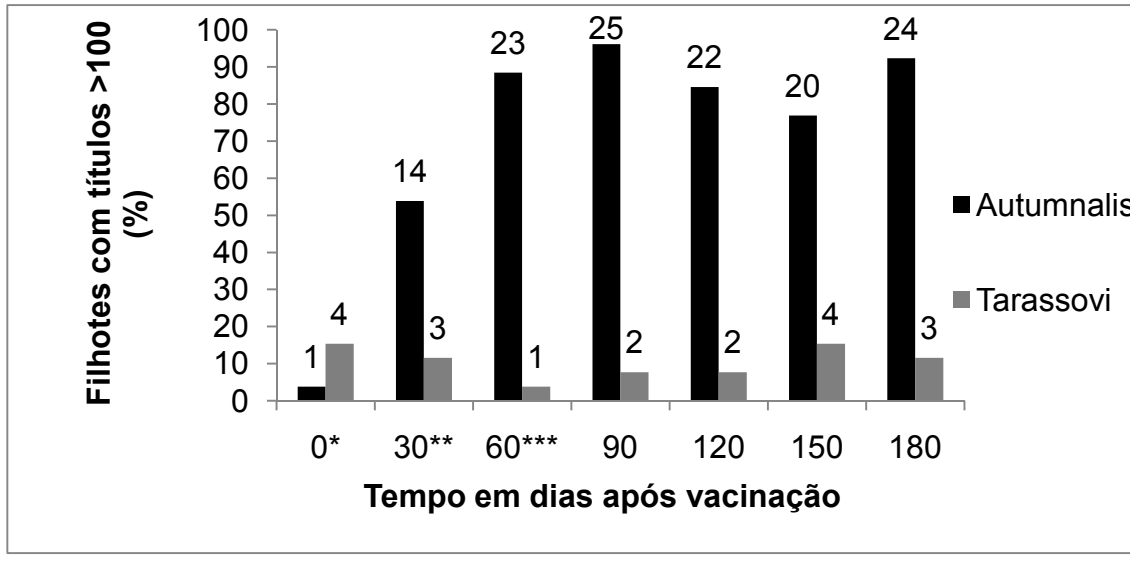
Nas diferentes colheitas nenhum cão do Grupo A apresentou títulos contra o sorovar Canicola e apenas três cães apresentaram títulos contra o sorovar Icterohaemorrhagiae (1:100, 1:200 e 1:3200) presentes na vacina. O cão que apresentou título de 1:3200 provavelmente foi exposto ao agente, pois era um animal de canil que convivia com vários cães e possível contato com ratos. Por esta razão não houve títulos detectáveis durante as seis primeiras colheitas e apenas na sétima apresentou títulos elevados para este sorovar. O que pode ser justificado por Schreiber et al. (2005) quando afirmaram que a vacinação pode conferir uma proteção e minimização dos sinais clínicos com rápida elevação dos títulos de anticorpos quando o animal é colocado em contato com o agente.

Diferentemente do Grupo A no grupo B não houve cães reagentes ao sorovar Icterohaemorrhagiae, e quatro cães apresentaram títulos de 1:100 contra o sorovar Canicola durante a colheita III e IV.

Não houve diferença estatística significante entre os títulos de anticorpos nas diferentes colheitas dos Grupos A e B ($p>0,05$), induzidos pela bacterina comercial utilizada. Exceto no dia 30 (colheita II) ($p<0,05$), na qual o Grupo B apresentou títulos para o sorovar Autumnalis em todos os cães avaliados, o que diferiu do Grupo A em que 35,29% (6/17) dos cães foram reagentes na SAM.

Ao comparar as respostas vacinais entre cães de um mesmo grupo, principalmente em busca de resposta imune distinta quanto as diferentes raças no Grupo A, observou-se que não houve diferença significante entre cães de um mesmo grupo (p>0,05).

Em ambos os grupos a resposta vacinal na SAM contra o sorovar Autumnalis excede a resposta aos sorovares contidos nas vacinas, não só do número de cães que apresentaram anticorpos anti-*Leptospira interrrogans* sorovar Autumnalis, mas também na magnitude e manutenção desta resposta quando comparados aos demais sorovares presentes na vacina. Tal fato também foi identificado na resposta contra o sorovar Tarassovi, porém, com menor titulação (Figura 4). O que enfatiza a possibilidade da ocorrência concomitante de uma infecção natural por estes sorovares.



Número sobre cada coluna do gráfico representa a frequência absoluta dos cães com títulos >100 em cada colheita.* 1ª dose ** 2ª dose *** 3ª dose.

Figura 4 - Frequência de filhotes (n=26) com títulos de anticorpos > 1:100 detectados na SAM contra *Leptospira interrogans* por sorovares não contidos na vacina.

O aumento de títulos SAM para o sorovar Autumnalis em ambos os grupos de cães após a vacinação contra os sorovares Canicola, Icterohaemorrhagiae, Pomona

e Grippotyphosa são contrários às conclusões sobre respostas vacinais frente à bacterinas comerciais em que afirmam ser sorovar específica (FAINE et al., 1999). Este resultado se aproxima do estudo de Barr et al. (2005) em que também relataram altos títulos de sorovar Autumnalis mesmo não estando presente na vacina administrada.

No dia 30 verificaram-se títulos para o sorovar Autumnalis que persistiram até os 180 dias pós-vacinais, em ambos os grupos, variando apenas a intensidade da resposta imunológica sem diferença estatística significante. Barr et al. (2005) afirmam que subunidades da vacina contra os sorovares Pomona e Grippotyphosa podem induzir títulos na SAM não só contra antígenos homólogos, mas também contra o sorovar Autumnalis.

Para Tabata et al. (2002) e Jaszczerski (2005) reações cruzadas podem ocorrer entre sorovares de um mesmo sorogrupo, que compartilhem antígenos em comum, com uma reativação da resposta imune direcionada a sorovares que não estejam presentes na vacina. Não é o caso do presente experimento, pois os sorovares Autumnalis e Tarassovi não pertencem a nenhum sorogrupo dos sorovares da vacina utilizada.

Gueguen et al. (2000) pesquisaram beagles filhotes e a resposta sorológica após a vacinação se mostrou transitória entre quatro e cinco meses com queda acentuada nos títulos, sendo que o sorovar Canicola manteve-se com maiores títulos quando comparados ao Icterohaemorrhagiae após a segunda dose. No entanto, ao contrário dos cães não vacinados (Grupo controle), os cães vacinados resistiram a desafio um ano após a utilização do protocolo de vacinação-padrão, sem qualquer reforço.

Gueguen et al. (2000) ainda ressaltaram que títulos de anticorpos IgM podem não estar relacionados ao nível de proteção de imunidade. Langoni et al. (2002) destacaram que o exame de SAM detecta principalmente anticorpos aglutinantes essencialmente representados pela classe IgM. Fato que talvez possa explicar a baixa resposta imune dos cães da presente pesquisa apresentar títulos abaixo do considerado protetor para cães após a vacinação.

Barr et al. (2005) e Teixeira et al. (2008) concluiram que, em alguns casos a magnitude da SAM pode não corresponder a presença de infecção por determinado

sorovar, embora seja esperada uma relação direta entre agente infectante e a reação na SAM.

Segundo Abdulkader et al. (2002) a resposta humoral específica em infecção por Leptospira caracteriza-se pela detecção de anticorpos IgM inicialmente (7-10 dias), a partir da segunda semana por detecção de IgG específicas e IgA geralmente detectadas a partir do quinto dia ate os nove meses pós-infecção, no entanto nem todos os pacientes produzem IgGs.

Os picos de anticorpos podem não ter sido identificados devido ao intervalo padronizado entre as colheitas e imunizações. Apesar de interessante, um período de colheita inferior a trinta dias não seria possível, devido a mistificação dos efeitos deletérios que os proprietários consideram frente às colheitas de sangue.

Os títulos sorológicos vacinais contra Leptospira em cães, no estudo de Maele et al. (2008) estavam abaixo de 1:800. No entanto, Greene et al. (2006) afirmam que os títulos vacinais contra os sorovares Canicola e Icterohaemorrhagiae podem exceder 1:800 mas não persistem por mais de três meses. Por outro lado Klaasen et al. (2003) e Minke et al. (2009) concluíram que a duração da imunidade induzida por uma vacina comercial bivalente contra os sorovares Canicola e Icterohaemorrhagiae perdura por um ano e protegem os cães do estado de portador renal e da sintomatologia clinica da doença. Destaca-se a preocupação quanto ao período de proteção pós-vacinal, que não pode ser padronizado em diferentes situações.

Pesquisadores cogitam a possibilidade de haver reações cruzadas e imunidade entre sorovares distintos, o que seria uma possível explicação para a resposta a sorovares não contidos na vacina da presente pesquisa. Sonrier et al. (2001) verificaram que frações comuns de LPS induziram completa proteção contra sorovares homólogos de um mesmo sorogrupo e proteção parcial contra desafio de sorovares heterólogos em modelos experimentais de roedores, com proteção cruzada entre os sorovares Canicola, Icterohaemorrhagiae e Autumnalis. Isso foi ratificado por Branger et al. (2005) que utilizaram vacina de DNA com os sorovares Autumnalis ou Grippotyphosa e demonstraram proteção cruzada contra o sorovar Canicola em desafio modelos experimentais.

Outras possíveis explicações para o desenvolvimento de elevados títulos para o sorovar Autumnalis frente ao desafio vacinal na presente pesquisa segundo Barr et al. (2005), pode estar relacionado com possível contaminação dos antígenos utilizados na SAM. Ou ainda que subunidades vacinais poderiam estar contaminadas com o sorovar Autumnalis ou que a resposta vacinal mensurada pela SAM pode não ser sorovar específica. As mesmas possibilidades se aplicam na resposta ao sorovar Tarassovi.

De acordo com Jaszczerski (2005) os títulos aglutinantes obtidos com a vacina comercial contra a leptospirose em cães, independentemente do sorovar, tornam-se indetectáveis pela técnica de SAM, a partir dos 90 dias pós-vacinais. No entanto, Langoni et al. (2002) afirmaram que apesar dos baixos títulos e da curta duração da resposta imune vacinal, a exposição de cães vacinados a leptospiras vivas resulta em rápida elevação de títulos de anticorpos protetores sugerindo uma boa memória imunológica.

As variáveis sexo, raça, tipo de alimentação, vacinação dos pais, presença de contactantes, roedores e acesso a rua não foram significativas na relação com os títulos vacinais nos cães avaliados (Tabela 1). Diferentemente do estudo realizado por Simón et al. (2009) que determinaram fatores que poderiam interferir na resposta de cães frente a vacina polivalente observaram que cães adultos apresentaram maiores títulos pós-vacinais contra Leptospira quando comparados aos filhotes, as fêmeas apresentaram média de títulos de anticorpos superiores aos machos e as raças avaliadas demonstraram respostas vacinais diferenciadas, sendo o cães da raça Montanha de Pirineo apresentaram títulos de anticorpos inferiores contra Leptospira quando comparadas as raças Golden Retriever e Labrador Retriever.

Langoni et al. (2002) observaram que não houve diferença significante nos valores medianos dos títulos de anticorpos entre machos e fêmeas nos dias 1, 8, 29, 36, 50 e 60 do experimento, o mesmo foi notado na presente pesquisa. Entretanto, nos demais dias avaliados os machos apresentaram maiores títulos em relação as fêmeas.

Tabela 1- Proporção de cães vacinados reagentes à *Leptospira* spp. sorovares Canicola, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae e Pomona, independente da colheita, de acordo com os fatores de risco analisados no inquérito epidemiológico, no município de Uberlândia, MG, 2009.

VARIÁVEL	CÃES		OR[a]	IC[b] 95%	P
	TOTAL	REAGENTE			
Sexo					
Macho	12	09	0,60	0,11-3,29	0,86
Fêmea	14	09			
Raça					
Rottwailer	04	02			
Cocker	05	02			
Beagle	02	02	0,68	0,10-4,52	0,94
Teckel	01	01			
Pit bull	05	05			
SRD	09	07			
Alimentação					
Ração	21	16	2,13	0,27-16,6	0,86
Ração+outros*	05	03			
Vacinação dos pais					
Sim	17	12	0,68	0,10-4,52	0,94
Não	9	7			
Contactantes					
Sim	17	11	0,22	0,02-2,29	0,39
Não	9	8			
Presença de roedores					
Sim	12	09	1,20	0.20-6,88	0,81
Não	14	10			
Acesso à rua					
Sim	05	03	2,13	0,27-16,6	0,86
Não	21	16			

[a]Oddis Ratio
[b] Intervalo de confiança
Se $p<0,05$ existe diferença significativa
*incluía comida caseira e derivados do leite

CONCLUSÃO

Não houve diferença significativa entre os títulos de anticorpos induzidos pela bacterina comercial anti-Leptospira utilizada em cães de diferentes raças. Animais vacinados não reagem necessariamente aos testes de diagnóstico como o SAM. Apenas o sorovar Pomona demonstrou títulos. Em ambos os grupos as respostas vacinais na SAM contra o sorovar Autumnalis e Tarassovi excederam os títulos dos sorovares contidos na vacina.

REFERÊNCIAS

ABDULKADER, R.C.R.M.; DAHER, E.F.; CAMARGO, E.D.; SPINOSA, C.; SILVA, M. V. Leptospirosis severity may be associated with the intensity of Humoral immune response. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.44, n.2, p.79-83, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rimtsp/v44n2/a05v44n2.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2010.

ALMEIDA, L.P.; MARTINS, L.F.S.; BROD, C.S.; GERMANO, P.M.L. Levantamento soroepidemiológico de leptospirose em trabalhadores do serviço de saneamento ambiental em localidade urbana da região sul do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.28, n.1, p.76-81, 1994. Disponível em:< http://www.scielo.br/pdf/rsp/v28n1/09.pdf>. Acesso em: 15 dez. 2009.

ANDRÉ-FONTAINE, G. Canine leptospirosis - Do we have a problem? **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.117, n.1, p.19-24, 2006. Disponível em:<http://www.scielo.br/pdf/rsp/v28n1/09.pdf>. Acesso em: 12 jul. 2008.

ARDUINO, G.G.C.; GIRIO, R.J.S.; FREIRE, M.M.; FILHO, M.M. Anticorpos contra *Leptospira* spp. Em bovinos leiteiros vacinados com bacterina polivalente comercial. Perfil sorológico frente a dois esquemas de vacinação. **Ciência Rural,** Santa Maria, v. 34, n. 3, p. 865-871, 2004. Disponível em:< http://www.scielo.br/pdf/cr/v34n3/a32v34n3.pdf>. Acesso em: 16 jul. 2008.

ARDUINO, G.G.C.; GIRIO, R.J.S.; MAGAJEVSKI, F.S.; PEREIRA, G.T. Títulos de anticorpos aglutinantes por vacinas comerciais contra leptospirose bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.29, n.7, p.575-582, 2009. Disponível em:< http://www.scielo.br/pdf/pvb/v29n7/13.pdf >. Acesso em: 16 fev. 2010.

ÁVILA, M.O.; FURTADO, LR.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 no Ano de 1995. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 28, n. 1, p. 107-110, 1998. Disponível em:<http://www.scielo.br/pdf/cr/v28n1/a18v28n1.pdf>. Acesso em: 14 mai. 2008.

AYRES M., AYRES JR. M., AYRES D.L., SANTOS, A.A.S. **Bioestat 5.0**: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. 6.ed. Belém, 2007.

BARR, S.C.; MCDONOUGH, P.L.; SCIPIONI-BALL,R.L.; STARR, J.K. Serologic responses of dogs given a commercial vaccine against *Leptospira interrogans* serovar Pomona and *Leptospira kirschneri* sorovar Grippotyphosa. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.66, n.10, p.1780-1784, 2005.

BOECHAT, J.U.D.; MACHADO, J.P. Prevalência da leptospirose canina no Brasil. **Veterinária Ser**, São Paulo, v.1, n.1, p.40-47, 2004.

BRANGER, C.; CHATERVET, B.; GAUVRIT, A.; AVIAT, F. Protection against *L. interrogans* sensu lato challenge by DNA immunization with gene encoding Hap1. **Infection and Immunity**, Washington, v.73, n.7, p.4062-4069, 2005. Disponível em:<http://iai.asm.org/cgi/content/full/73/7/4062>. Acesso em: 12 nov. 2009.

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

CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. **Manual de métodos para el diagnóstico laboratório de la Leptospirosis**. Nota técnica 30, Washington, DC, p.15-25. 1985.

DAY, M.J. Imune system development in the dog and cat. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v.137, s.1, p.10-15, 2007. Disponível em:< http://www.sciencedirect.com/science/journal/00219975>. Acesso em: 16 out. 2009.

FAINE, S ; ADLER. B.; BOLIN,C.; PEROLAT, P. **Leptospira and leptospirosis**. 2. ed. Melbourne: MedSci, 1999. 272 p.

GREENE, C.E.; SYKES, J.E.; BROWN, C.A.; HARTMANN, K. Leptospirosis. In: **Infections Diseases of the dog and cat**, 3 ed. Saunders Elsevier: St Louis, 2006, p.402-417.

GUEGUEN, S.; MALH, P.; LEUCOUTRE, C.; AUBERT, A. Duration of immunity and clinical protection against canine leptospirosis with a multivalent vaccine. In: Anclivepa Congress, **Anais**.... Rio de Janeiro: Anclivepa, 2000. p. 1-16. Disponível em:<http://laboratoriouniversal.com/biblioteca/LEPTOSPIROSIS_%20respuesta%20inmunitaria%20con%20Canigen.pdf>. Acesso em: 16 nov. 2009.

HORZINEK, M.C. Vaccination protocols for companion animals: The veterinarian is perspective. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v.142, s.1, p.129-132, 2010. Disponível em:< http://www.sciencedirect.com/science/journal/00219975>. Acesso em: 15 fev. 2010.

JASZCZERSKI, D.C.F.C. **Cinética da resposta imune humoral em cães imunizados com *Leptospira interrogans* sorovares icterohaemorragiae, canicola, pomona e grippotyphosa.** 2005. 82 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

KLAASEN, H.L.B.M.; MOLKENBOER, M.J.C.H.; VRIJENHOEK, M.P.; KAASHOEK, M.J. Duration of immunity in dogs vaccinated against leptospirosis with a bivalent inactivated vaccine. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.95, n.1-2, p.121-132, 2003. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12860082 >. Acesso em: 20 out. 2009.

LANGONI, H.; PIMENTEL, V.L.; SILVA, A.V.; LUCHEIS, S.B.; DENARDI, M.B. Avaliação da dinâmica de anticorpos pós-vacinais contra *Leptospira* spp. em cães

vacinados pela prova de SAM. **ARS Veterinária**, Jaboticabal, v.18, n.1, p.54-61, 2002.

LOVATTO, P.A.; LEHNEN, C.R.; ANDRETTA, I.; CARVALHO, A.D.; HAUSCHILD, L. Meta-análise em pesquisas científicas-enfoque em metodologias. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.36, n.0, p.285-294, 2007. Disponível em:< http://www.scielo.br/pdf/rbz/v36s0/26.pdf >. Acesso em: 31 mar 2010.

MAELE, I.V.; CLAUS, A.; HAESEBROUCK, F; DAMINET, S. Leptospirosis in dogs: a review with emphasis on clinical aspects. **Veterinary Record**, London, v.163, n.14, p.409-413, 2008. Disponível em: < http://veterinaryrecord.bvapublications.com/cgi/content/163/14/409>. Acesso em: 14 jul. 2009.

MAGALHÃES, D.F.; SILVA, J.A.; MOREIRA, E.C.; WILKE, V.M.L.; HADDAD, J.P.A.; MENESES, J.N.C. Prevalência de aglutininas anti-*Leptospira interrogans* em cães de Belo Horizonte, Minas Gerais, 2001 a 2002. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 2, p. 167-174, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v58n2/29657.pdf>. Acesso em: 14 ago. 2008.

MARINHO, M.; LANGONI, H.; OLIVEIRA, S.L.; CARREIRA, R.; PERRI, S.H.V.; LUVIZOTO. Resposta humoral, recuperação bacteriana e lesões histológicas em camundongos geneticamente selecionados para bons e maus produtores de anticorpos e balb/c, frente à infecção por *Leptospira interrogans* sorovar Iceterohaemorrhagiae. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 23, n.1, p.5-12, 2003.

MARINHO, M. Leptospirose: Fatores epidemiológicos, fisiopatológicos e imunopatogênicos. **Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v.15, n.3, p.428-434, 2008.

MINKE, J.M.; BEY, R.; TRONEL, J.P.; LATOUR, S.; COLOMBERT, G.; YVOREL, J.; CARIOU, C.; GUIOT, A.L.; COZETTE, V.; GUIGAL, P.M. Onset and duration of

protection immunity against clinical disease and renal carriage in dogs provided bi-valent inactivated Leptospirosis vaccine. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.137, n.1-2, p.137-145, 2009. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science?_ob=PublicationURL&_tockey>. Acesso em: 20 out. 2009.

MONTEIRO, G.R.G. **Efetividade da doxiciclina na profilaxia contra Leptospirose**. 2003. 61 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, 2003.

RIBEIRO, M.G.; BELONI, S.N.; LANGONI, H.; SILVA, A.V. Leptospirose canina. **Boletim técnico**. Departamento Técnico Fort Dodge Saúde Animal, (S.I., s.n.), 2003. Disponível em: < http://www.duramunemax.com.br/boletins/boletimLepto.pdf>. Acesso em 05 jan. 2008.

SCHEREIBER, P.; MARTIN, V.; NAJBAR, W.; SANQUER, A.; GUEGUEN, S.; LEBREUX, B. Prevention of renal infection and urinary shedding in dogs by a *Leptospira* vaccination. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.108, n.1-2, p. 113-118, 2005. Disponível em:< http://www.sciencedirect.com/science/journal/03781135>. Acesso em: 09 out. 2008.

SCHULTZ, R.D.; THIEL, B.; MUKHTAR, E.; SHARP, P.; LARSON, L.J. Age and long-term protective immunity in dogs and cats. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v.142, s.1, p.102-108, 2010. Disponível em:< http://www.sciencedirect.com/science/journal/00219975>. Acesso em: 15 fev. 2010.

SIMÓN, V.M.C.; RODRIGUEZ, C.; MARTINEZ, A.J.L. Estado imune humoral frente al vírus Del Moquillo canino, el Parvovírus canino y Leptospiras em um criadero. **Revista Eletrônica de Veterinária**, v.10. n.4, 2009. Disponível em:< http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040409.pdf>. Acesso em: 09 fev. 2010.

SRIVASTAVA, S.K. Prospects of developing leptospiral vaccines for animals. Indian **Journal of Medical Microbiology**, Índia, v.24, n.4, p.331-336, 2006. Disponível em: < http://www.ijmm.org/article.asp?issn=02550857=Srivastava>. Acesso em 15 set. 2008.

SONRIER, C.; BRANGER, C.; MICHEL, V.; RUVOEN-CLOUET, N.; GANIÈRE, J.P.; ANDRÉ-FONTAINE, G. Evidence of cross-protection within *Leptospira interrogans* in an experimental model. **Vaccine**, Kidlinton, v.19, n.1, p.86-94, 2001. Disponível em:< http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10924790>. Acesso em 15 nov 2008.

TABATA, R.; SCANAVANI NETO, H.; ZUANAZE, M.A.F.; OLIVEIRA, E.M.D.; DIAS, R.A.; MORAIS, Z.M.; ITO,F.H.; VASCONCELLOS, S.A. Cross neutralizing antibodies in hamsters vaccinated with leptospiral bacterins produced with three serovars of serogroup serjoe. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.33, n.3, p.265-268, 2002. Disponível em:<http://www.scielo.br/pdf/bjm/v33n3/v33n3a16.pdf>. Acesso em: 25 nov 2009.

TEIXEIRA, M.A.; GONÇALVES, M.L.L.; RIEDIGER, I.N.; PROSSER, C.S; SILVA, S.F.C.; BIESDORF, S.M.; MOSKO, P.R.E.; MORAIS, H.A.; BIONDO, A.W. Sorologia negativa e PCR positiva: a importância da biologia molecular para o diagnóstico de leptospirose aguda em um cão. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v.8, n.73, p. 44-48. 2008.

TIZARD, I.R. Vacinação e Vacinas. In: **Imunologia veterinária: Uma Introdução**. 6 ed. Roca: São Paulo, 2002, p.261-281.

WANG, Z.; JIN, L.; WEGRZYN, A. Leptospirosis vaccines. **Microbial Cell Factories**, United States, v.6, n.39, p.1-10, 2007. Disponível em: <http://www.microbialcellfactories.com/content/6/1/39>. Acesso em: 22 out. 2009.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por ser uma doença endêmica no Brasil, e haver uma tendência na utilização de esquemas vacinais polivalentes frente à diversidade dos sorovares, faz-se necessária à atualização da imunoprofilaxia desta doença. O Protocolo vacinal não pode ser igual para diferentes regiões geográficas.

A frequência de cães reagentes sorovares incomuns como o Autumnalis na espécie canina desperta a necessidade de se reconsiderar os procedimentos de prevenção da leptospirose, principalmente no tocante a produção de vacinas, intensificando as medidas de controle e erradicação da doença, principalmente no período chuvoso em que ocorre a elevação significativa da leptospirose canina no município de Uberlândia, MG.

A presente pesquisa alerta para os ricos à infecção aos que os cães vacinados anualmente estão submetidos. Alerta-se para a necessidade de prevenir infecções por outros sorovares não contidos nas vacinas comerciais.

Para o controle efetivo da leptospirose será importante a implantação de programa de saúde pública adequado, que se fundamente em práticas de higiene, vacinação e diagnóstico precoce, além de tratamento apropriado com a erradicação dos portadores renais. Além disto, a identificação dos sorovares prevalentes nas diferentes regiões do país juntamente com implantação de medidas de manejo associadas com o controle de roedores sinantrópico e populacional de cães errantes, a fim de minimizar a incidência em populações canina e humana.

ANEXOS

ANEXO 1- Aprovação do Comitê de Ética para os Capítulos 2 e 3.

Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA)

Campus Santa Mônica, Bloco 1J
www.comissoes.propp.ufu.br
Telefone: 3239.4531

PARECER 015/08

Projeto: Prevalência da Leptospirose em cães no município de Uberlândia, MG.

Pesquisadores responsáveis: Ana Maria Monteiro Correia Lima.

Submetido ao Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) em formulário próprio para Protocolo de Utilização de Animais, a pesquisa não envolve danos ou riscos significativos aos animais envolvidos e obedece às normas éticas preconizadas, recebendo parecer:

APROVADO.

Uberlândia, 10 de agosto de 2008.

Prof. Dr. Alcino Eduardo Bonella,
Coordenador do CEUA

ANEXO 2- Aprovação do Comitê de Ética para o Capítulo 4.

Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA)

Campus Santa Mônica, Bloco 1J
www.comissoes.propp.ufu.br
Telefone: 3239.4531

PARECER 022/08 CEUA

Docente Pesquisador/Responsável: Profa. Dra. Anna Monteiro C. Lima
Unidade Acadêmica: Faculdade de Medicina Veterinária.

Título do projeto: "Cinética da resposta imune humoral em cães jovens imunizados com *Leptospira interrogans*."

O Projeto não representa riscos significativos aos animais envolvidos (imunização seguida de coleta de sangue), e assim sendo o CEUA emite parecer favorável à sua realização.

Parecer: Aprovada

Uberlândia, 12 de agosto de 2008.

Prof. Dr. Alcino Eduardo Bonella
Coord. CEUA - UFU

ANEXO 3- Sorogrupos e alguns sorovares da *Leptospira interrogans sensu lato*.

SOROGRUPOS	SOROVARES
Icterohaemorrhagiae	**Icterohaemorrhagiae**, Copenhageni, Lai
Hebdomadis	Hebdomadis, Jules, Kremastos
Autumnalis	Autumnalis, Fortbragg, Bim, Weerasinghe
Pyrogenes	Pyrogenes
Bataviae	Bataviae
Grippotyphosa	**Grippotyphosa,** Canalzonae, Ratnapura
Canicola	**Canicola**
Australis	Australis, Bratislava, Lora
Pomona	**Pomona**
Javanica	Javanica
Sejroe	Sejroe, Saxkoebing, Hardjo
Panama	Panama, Mangus
Cynopteri	Cynopteri
Djasiman	Djasiman
Sarmin	Sarmin
Mini	Mini, Georgia
Tarassovi	Tarassovi
Ballum	Ballum, Aroborea
Celledoni	Celledoni
Louisiana	Louisiana, lanka
Ranarum	Ranarum
Manhao	Manhao
Shermani	Shermani
Hurstbridge	Hurstbridge

LEVETT, P.N. Leptospiosis. **Clinical Microbioly Reviews**, v.14, n.2, p.297, 2001.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Cálculo da amostragem de cães utilizados no capítulo 2.

Para a determinação do tamanho da amostra (n), admitiu-se uma prevalência esperada da doença de 26% (BOECHAT; MACHADO, 2004), um nível de confiança de 95% e um erro tolerável de aproximadamente de 5% (0,0525). De acordo com Ayres et al. (2007), amostragem aleatória simples utilizada foi:

$$n = \frac{z^2_{\alpha/2} . p . q}{e^2}$$, onde n= tamanho amostral

$z_{\alpha/2}$= intervalo de confiança

p= prevalência esperada(probabilidade de sucesso)

q=(1-p) probabilidade de insucesso

e= erro tolerável

Substituindo os valores na fórmula:

$$n = \frac{1{,}96^2 . 0{,}26 . 0{,}74}{(0{,}0525)^2}$$

n= 268 cães

APÊNDICE B - Questionário aplicado aos proprietários para a avaliação dos fatores de risco relacionado com a ocorrência da Leptospirose em cães, no município de Uberlândia, MG, 2008.

Nome do proprietário: _____
Endereço: _____ CEP _____
Telefone: _____
Nome do animal:_____Animal número: _____ Sexo: ( )M ( )F
Idade:_____
Vacinação: ( ) V8 ( )V10 ( )AR ( ) Outras_____
Tipo de alimentação: ( ) Ração comercial ( ) Alimentação caseira ( )Derivados de leite ( ) Carne crua
Domicílio: ( ) Canil ( ) Rural ( )
Acesso à rua: SIM ( ) NÃO ( ) Presença de ratos: SIM ( ) NÃO ( )
Histórico de Lepto animal e/ou humana: SIM ( ) NÃO ( )
Terrenos baldios ou entulho nas proximidades: SIM ( ) NÃO ( )

APÊNDICE C – Ficha de identificação

Universidade Federal de Uberlândia

Ficha de Identificação*

1-INFORMAÇÕES REFERENTES AO PROPRIETÁRIO E A PROPRIEDADE

Nome do proprietário: _____
Endereço: _____
Cidade: _____ Estado: _____
CEP: _____
Telefone: _____celular: _____
Nome do canil:_____ Domicílio: _____
Presença de ratos:_____ Histórico de Lepto animal e/ou humana:_____
Terrenos baldios ou entulho nas proximidades:_____

2-INFORMAÇÕES REFERENTES AOS ANIMAIS

Nome do animal:_____ Animal número: _____
Identificação: _____ Peso:_____ Raça:_____
Pelagem:_____ Sexo:_____
Data de Nascimento:_____Idade a primeira vacinação:_____
Característica individual:_____
Tipo de instalação:_____
Tipo de alimentação:_____
Vacinação materna:_____
Vacinação paterna:_____
Ingeriu colostro:_____ Nº de filhotes:_____Parto normal:_____
Habilidade materna:_____
Acesso à rua:_____
Vermifugação:_____ Presença de ectoparasitas:_____
Desmame aos:_____dias Período chuvoso:_____

3-INFORMAÇÕES REFERENTES A CONTACTANTES
Presença de outros animais no local?
Cães ( ) Quantidade_____Outras espécies( ) Quais e quantos_____
Saúde dos contactantes:_____
Contato: Direto( ) Indireto( ) Separados como_____
Observações:

*Adaptado de Santos (2007)
SANTOS, J. P. **Soroprevalência e aspectos epidemiológicos da leptospirose caprina no município de Uberlândia, MG**. 2007. 72f. Dissertação (Mestrado: Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

APÊNDICE D – Termo de Compromisso

Universidade Federal de Uberlândia

TERMO DE COMPROMISSO

Eu , Rg , CPF residente na , responsável pelo canil
autorizo a participação da coleta de sangue dos cães filhotes sob minha propriedade e me comprometo a acompanhar e informar o destino do animal até a completa realização do procedimento. Serão feitas 7 coletas de sangue, em intervalo definidos e agendados com antecedência e entregue ao proprietário em um cartão com as datas previstas de coletas que contribuirão para a dissertação de mestrado **Cinética da resposta imune humoral em cães jovens imunizados com *Leptospira interrogans*** da mestranda Jacqueline Ribeiro de Castro sobre supervisão da Professora Doutora Anna Monteiro Correia Lima.
Como compromisso da parte requisitora será feita a doação das três doses iniciais da vacina V10 (Vacina Duramune Max-CvK/4L) que será aplicada por um profissional especializado aos 45ºdias, 75º e 105º dias de vida, não incluirá neste projeto os reforços anuais que serão de inteira responsabilidade do proprietário.
Tenho ciência que não estará incluso a prestação de assistência médica veterinária aos mesmos durante o procedimento que se estenderá até os sete meses de vida do animal, salvo reações pós-vacionais relacionadas com esta vacina; ciente que se o animal ficar enfermo durante este período o proprietário arcará inteiramente com as despesas.
Mediante requisitos detalhados acima concordo e autorizo tal procedimento.

_____
Assinatura

Uberlândia, _____ de _____ , de 200___.