

WILSILENE APARECIDA SILVA COELHO

**Potência de bacterinas anti-leptospirose canina comercializadas
no Brasil:** desafio efetuado com estirpes autóctones dos
sorovares Canicola e Copenhageni.

**São Paulo
2010**

WILSILENE APARECIDA SILVA COELHO

**Potência de bacterinas anti-leptospirose canina comercializadas no
Brasil: desafio efetuado com estirpes autóctones dos sorovares
Canicola e Copenhageni**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Francisco Rafael Martins Soto

**São Paulo
2010**

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2332
FMVZ

Coelho, Wilsilene Aparecida Silva

Potência de bacterinas anti-leptospirose canina comercializadas no Brasil: desafio efetuado com estirpes autóctones dos sorovares Canicola e Copenhageni / Wilsilene Aparecida Silva Coelho. -- 2010.

64 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.
Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Rafael Martins Soto.

1. Potência. 2. Cães. 3. Leptospirose animal. 4. Vacina. 5. Hamsters. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética para uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Potência de bacterinas anti-leptospirose canina comercializadas no Brasil. Desafio efetuado com estirpes virulentas autóctones dos sorovares Canicola e Copenhageni", protocolado sob o nº1812/2009, utilizando 350 (trezentos e cinquenta) hamsters, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Francisco Rafael Martins Soto, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética para uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 25/11/2009.

We certify that the Research "Power of bacterins anti leptospirosis canine marketed in Brazil. Challenge performed with virulent strains of autochthonous Canicola and Copenhageni" protocol number 1812/2009, utilizing 350 (three hundred fifty) hamsters, under the responsibility Prof. Dr. Francisco Rafael Martins Soto, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethics Committee for animal use" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo was approved in the meeting of day 11/25/2009.

São Paulo, 30 de novembro de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Presidente



Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: COELHO. Wilsilene Aparecida Silva

Título: Potência de bacterinas anti-leptospirose canina comercializadas no Brasil: desafio efetuado com estirpes autóctones dos sorovares Canicola e Copenhageni.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Assinatura _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Assinatura _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Assinatura _____ Julgamento _____

Dedicatória

Aos meus Pais, Josi e Wilson, pela vida, por todo incentivo, dedicação, oportunidade, pelo apoio em minha caminhada e pelo amor incondicional.

Minha Mãe, D. Josi, pelas palavras de incentivo e amor, que não me deixaram desistir no momento mais difícil e que me fizeram lembrar da promessa que tinha feito ao meu Pai, de jamais desistir de nada, se realmente esse fosse meu desejo.

Meu Pai, Sr. Wilson, um homem simples, mais de coração enorme, seu sorriso me faz falta, sei que onde estiver, estará me abençoando, com seu jeitinho tímido. Sei que o senhor está orgulhoso com mais essa vitória. O senhor foi e sempre será minha fortaleza, onde irei sempre buscar força para enfrentar todos os obstáculos que encontrar durante toda a minha vida. Obrigado por estar sempre ao meu lado, cuidando e iluminando o meu caminho.

Ao meu marido, Claudio, pelos momentos de amor, afeto, carinho, cuidado, ensinamento de vida e principalmente pela paciência e quanta paciência.

Aos meus irmãos, Fátima, Wilsinéia, e Francisco, por estarem sempre presentes nessa trajetória.

Aos meus cunhados e cunhadas, meu sogro e sogra, meus sobrinhos e sobrinhas, a todos meus amigos, que nos momentos difíceis e alegres, sempre estiveram presentes.

Aos meus avós, todos anjos, obrigado por estarem com meu Pai e juntos cuidando de mim e da minha família.

“...seja o que vier, venha o que vier, qualquer dia amigo eu volto a te encontrar, qualquer dia amigo a gente vai se encontrar...”

*Canção da América
Milton Nascimento*

"...os homens plantam cinco mil rosas num mesmo jardim e não encontram o que procuram. E, no entanto, o que eles procuram poderia ser encontrado numa só rosa (...). Mas os olhos são cegos. É preciso ver com o coração".

"O essencial é invisível aos olhos".

*(O Pequeno Príncipe
Antoine de Saint-Exupéry)*

*"Superfície azul do céu,
asas em curva de dores,
Fernão Capelo levanta e voa,
porque voar é importante,
mais que comer e viver.*

*Caro é pensar diferente,
viver em infinitos,
voar dias inteiros
só aprendendo a voar.*

*Gaivota que se preza
tem de sentir as estrelas,
analisar paraísos,
conquistar múltiplos espaços.*

*Gaivota que se preza
precisa buscar perfeição.
Importante é olhar de frente,
em uma, em dez, cem mil vidas.*

*Para Fernão nada é limite:
voa, treina, aprende,
paira sobre o comum do viver.*

*Se o destino é o infinito,
o caminho é nas alturas!"*

(Fernão Capelo gaivota - Richard Bach)

"Deus nos concede, a cada dia, uma página de vida nova no livro do tempo. Aquilo que colocarmos nela, corre por nossa conta."

(Chico Xavier)

Agradecimentos

A Deus, por me dar a oportunidade de realizar mais um de meus sonhos.

Ao meu primeiro orientador, Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos, que no momento mais difícil, foi quem me estendeu a mão e disse que aquele era o momento certo. Obrigada pelo apoio, pela oportunidade, por acreditar que eu seria capaz de concluir este sonho.

Ao meu segundo orientador, Prof. Dr. Francisco Rafael Martins Soto, pela atenção, pelo companheirismo nas correções, pelos puxões de orelha, característico de um irmão e por acreditar que chegaríamos lá. Obrigada.

Aos pais do meu orientador, Sr. Luiz e Sra. Madalena, pela acolhida, simpatia e atenção que nos foi dada.

A Zenaide, pela ajuda no desenvolvimento desse trabalho, pela amizade e por ser essa profissional exemplar.

A Gisele, pela amizade, pela ajuda, pela troca de conhecimento, pelo apoio nos momentos difíceis.

A amiga Cássia, companheira em todas as disciplinas, minha válvula de escape.

Aos novos amigos que do Laboratório de Zoonoses Bacterianas: Amane, Pilar, Marianna, Flavia Morato, Flavia Carol, Ricardo, Carlos, Viviane, Adriana, Tania, Dona Odete, pela amizade e carinho.

Aos novos amigos do VPS: Sheila, Sandra, Orlando Bispo, Danival, Cristina, Virginia, Alê, Renatinho, Jucélia pela força e amizade.

A Universidade de São Paulo, a FMVZ, e em especial ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, na figura de seus docentes e funcionários, pelos ensinamentos e experiências.

A Profa. Dra. Sônia Regina Pinheiro, pelas palavras de otimismo e incentivo.

Ao Prof. Dr. Fumio H. Ito, pelas aulas e pela ajuda na elaboração do abstract.

Aos amigos do biotério, pela atenção e disposição.

A Carol, pela atenção e pelo café toda manhã, sem o qual não me manteria acordada.

Aos funcionários da Biblioteca da FMVZ/USP, pela atenção, colaboração na verificação das normas de publicação.

A todos, que em algum momento deste trabalho, tiveram seu envolvimento por menor que tenha sido, meu OBRIGADO.

RESUMO

COELHO, W. A. S. **Potência de bacterinas anti-leptospirose canina comercializadas no Brasil: desafio efetuado com estirpes autóctones dos sorovares Canicola e Copenhageni.** [Potency of canine anti-leptospirosis bacterins marketed in Brazil: challenge effectuated with indigenous strains of the serovars Canicola and Copenhageni]. 2010. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Foi efetuada a avaliação comparativa da potência de vacinas anti-leptospirose canina comercializadas no Brasil, empregando no desafio estirpes de leptospiras dos sorovares Canicola e Copenhageni autóctones isoladas no Brasil. Foram comparadas nove bacterinas comerciais polivalentes produzidas para uso em cães, identificadas pelas letras A, B, C, D, E, F, G, H e I. O desafio foi efetuado com as estirpes L₁-130 e LO₄, respectivamente dos sorovares Copenhageni e Canicola tipificadas pela prova de anticorpos monoclonais. O protocolo adotado seguiu as normas técnicas americanas, 9 CFR 113.103 – Leptospirose Canicola - 2006 . A dose infectante do sorovar Copenhageni empregada no desafio (5,4) foi inferior ao limite inferior estabelecido pela norma técnica (10) e a do sorovar Canicola foi de 10.000. Os animais foram observados por 21 dias consecutivos, contabilizando-se os que morreram por leptospirose. Ao final deste período, os sobreviventes foram submetidos à eutanásia por inalação de gás carbônico (câmara de CO₂), e necropsiados para colheita dos rins e realização de cultivos destinados ao controle de infecção renal por leptospiras. Das nove vacinas avaliadas, sete foram reprovadas para os dois sorovares testados e duas foram aprovadas contra a doença clínica e infecção renal para o sorovar Canicola LO₄, porém apenas contra a doença clínica para o sorovar Copenhageni L₁-130. Os laboratórios fabricantes de bacterinas anti-leptospirose canina que estão sendo comercializadas no Brasil, necessitam rever a qualidade dos seus produtos no relativo a proteção contra a doença e infecção pelos sorovares Canicola e Copenhageni.

Palavras-chave: Potência. Cães. Leptospirose animal. Vacina. Hamsters

ABSTRACT

COELHO, W. A. S. **Potency of canine anti-leptospirosis bacterins marketed in Brazil: challenge effectuated with indigenous strains of the serovars Canicola and Copenhageni.** [Potência de bacterinas anti-leptospirose canina comercializadas no Brasil: desafio efetuado com estirpes autóctones dos sorovares Canicola e Copenhageni]. 2010. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

A comparative evaluation of the potency of canine anti-leptospirosis bacterins marketed in Brazil was conducted using as the challenge strains the indigenous leptospire, serovars Canicola and Copenhageni, isolated in Brazil. There were compared nine commercial polyvalent bacterial vaccines produced for use in dogs, identified by the letters A, B, C, D, E, F, G, H and I. The challenge was performed with L₁-130 and LO₄ strains, respectively, of the serovars Copenhageni and Canicola, which have been typified by the monoclonal antibodies (MABs). The adopted protocol followed the American standard techniques, 9 CFR 113.103 – Leptospirosis Canicola – 2006. The infectious dose of the serovar Copenhageni used in the challenge (5.4) was inferior to the lower limit established by the technical standard (10) and that of the serovar Canicola was of 10,000. The animals (hamsters) were observed for 21 consecutive days, registering those died of leptospirosis. At the end of the observation period, the survivors were subdued to the euthanasia by inhalation of carbon gas (CO₂ chamber), and necropsied, taking the kidneys for bacterial culturing for the evaluation of renal infection by leptospire. Among nine evaluated vaccines, seven failed for the two serovars tested and two were approved against the clinical disease and renal infection by the serovar Canicola LO₄, however serovar Copenhageni L₁-130 was effective only against manifestation of the clinical disease. The manufacturers of the canine anti-leptospirosis bacterial vaccines which are being marketed in Brazil need to revise the quality of their products in respect to the protection conferred against the disease and against the infection by the serovars Canicola and Copenhageni.

Key-words: Potency. Dogs. Animal leptospirosis. Vaccines. Hamsters.

Listas de Ilustrações

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Hamsters infectados com estirpes de leptospiros patogênicas segundo a diluição do inóculo infeccioso, a estirpe de leptospira e a proporção de mortes por leptospirose. São Paulo, 2010..... 44
- Tabela 2 - Hamsters imunizados com vacinas comerciais anti-leptospirose canina e desafiados com a estirpe de leptospira autóctone LO₄ do sorovar Canicola, segundo o código de identificação da bacterina e a proporção de animais sobreviventes aos 21 dias de desafio. São Paulo, 2010..... 45
- Tabela 3 - Hamsters imunizados com vacinas comerciais anti-leptospirose canina desafiados com estirpe L₁-130 de leptospira autóctone do sorovar Copenhageni segundo o código de identificação da bacterina e a proporção de animais sobreviventes aos 21 dias do desafio. São Paulo, 2010..... 46
- Tabela 4 - Proporção de hamsters imunizados com bacterinas anti-leptospirose canina e sobreviventes ao desafio com leptospiros patogênicas, caracterizados como portadores renais de leptospiros aos 21 dias do desafio segundo o código de identificação da bacterina e a estirpe de desafio empregada. São Paulo, 2010..... 48

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Hamsters imunizados com vacinas comerciais anti-leptospirose canina e desafiados com estirpes autóctones dos sorovares Canicola LO₄ e Copenhageni L₁-130, segundo o código de identificação da bacterina e a proporção de sobreviventes aos 21 dias do desafio, expresso em porcentagem. São Paulo, 2010..... 47
- Figura 2 - Proporção de hamsters imunizados com bacterinas anti-leptospirose canina que sobreviveram ao desafio e de animais caracterizados como portadores renais de leptospiras aos 21 dias do desafio, segundo o código de identificação da bacterina empregada. São Paulo, 2010..... 49
- Figura 3 - Proporção de hamsters imunizados com bacterinas anti-leptospirose canina que sobreviveram ao desafio e de animais caracterizados como portadores renais de leptospiras aos 21 dias do desafio, segundo o código de identificação da bacterina empregada. São Paulo, 2010..... 50

Lista de Abreviaturas e Símbolos

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	- porcentagem
°C	- graus Celsius
µL	- microlitro
CO ₂	- gás carbônico
CFR	- Code Federation Regulation
DL50	- dose letal capaz de matar 50% dos animais
DNA	- ácido desoxirribonucléico
d.p.i.	- dias pós-infecção
EMJH	- Ellinghausen, McCullough, Johnson e Harris
FIOCRUZ	- Fundação Osvaldo Cruz
LO ₄	- Leptospira interrogans sorovar Canicola estirpe LO ₄
LPS	- lipopolissacarídeo
L ₁ -130	-Leptospira interrogans sorovar Copenhageni estirpe L ₁ -130
mL	- mililitro
OMS	- Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	OBJETIVO GERAL	22
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3	REVISÃO DE LITERATURA	23
3.1	LEPTOSPIROSE CONCEITO	23
3.2	IMPORTÂNCIA EM SAÚDE ANIMAL E SAÚDE PÚBLICA	23
3.3	ETIOLOGIA	25
3.4	CADEIA EPIDEMIOLOGICA	26
3.4.1	Fontes de infecção	27
3.4.2	Reservatórios e portadores	27
3.4.3	Vias de eliminação	30
3.4.4	Fatores condicionantes	30
3.5	PATOGENIA	31
3.6	DIAGNÓSTICO	32
3.6.1	Métodos diretos de detecção do agente	33
3.6.2	Métodos indiretos de detecção do agente	34
3.7	PROFILAXIA	35
4	MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1	ANIMAIS	38
4.2	BACTERINAS	38
4.3	ESTIRPES DE DESAFIO	39
4.4	DESAFIO EM HAMSTER	40
4.5	ISOLAMENTO DE LEPTOSPIRAS PARA O CONTROLE DO ESTADO DE PORTADOR RENAL	41
4.6	ANALISE ESTATISTICA	42

5	RESULTADOS.....	43
5.1	TITULAÇÃO DO INÓCULO INFECTANTE DE DESAFIO.....	43
5.2	PROTEÇÃO CONTRA A DOENÇA.....	45
5.3	PROTEÇÃO CONTRA A INFECÇÃO	48
6	DISCUSSÃO	51
7	CONCLUSÕES	54
	REFERÊNCIAS.....	55

1. INTRODUÇÃO

O cão é o hospedeiro natural da *Leptospira interrogans* sorovar Canicola e o rato de esgoto (*Rattus norvegicus*) o hospedeiro natural de *Leptospira interrogans* sorovares Icterohaemorrhagiae e Copenhageni (HAGIWARA, 2003).

Duas formas clínicas de leptospirose são conhecidas no cão há mais de um século a infecção pelo sorovar Icterohaemorrhagiae, caracterizada pelo comprometimento hepático e renal, de evolução grave que pode culminar com a morte em poucos dias e a provocada pelo sorovar Canicola também denominada de Moléstia de Stuttgart, cuja manifestação clínica está mais associada ao comprometimento renal (GREENE, 1998).

Os sorovares de leptospirose já isolados de cães no mundo são: Icterohaemorrhagiae, Canicola, Pomona, Autumnalis, Gryppotyphosa, Pyrogenes, Copenhageni, Bratislava e Bataviae (NIELSEN, 1991; LEVETT, 2001). A doença causada por esses sorovares pode variar de formas graves, com icterícia e insuficiência renal a até quadros leves, praticamente assintomáticos. Contudo os animais podem albergar as leptospirosas nos rins e passam a eliminá-las para o meio ambiente, contribuindo assim para a transmissão da doença a outros animais e inclusive aos seres humanos (HAGIWARA, 2003).

A ocorrência da leptospirose em seres humanos e animais pelo sorovar Icterohaemorrhagiae pode ser explicada pela distribuição cosmopolita do rato de esgoto, particularmente nos locais onde as condições sanitárias do meio ambiente são precárias. No Brasil, tem sido demonstrado que dos componentes do sorogrupo Icterohaemorrhagiae, tem predominado a infecção pelo sorovar Copenhageni, tanto no homem quanto no cão (SAKATA, 1992; KO, 1999; PEREIRA, 2000).

Os fatores de risco associados a leptospirose canina incluem: densidade populacional do reservatório natural, ecossistema onde o cão vive, o tipo de utilização do cão (caça, guarda, pastoreio, recreação) e períodos de elevada precipitação pluviométrica, quando as condições de umidade favorecem a

sobrevivência das leptospirosas patogênicas no ambiente (YASUDA, 1980; RUBEL, 1997; WARD, 2002b).

A imunidade na leptospirose canina, basicamente do tipo humoral é sorovar-específica e em menor extensão sorogrupo específica. As vacinas atualmente utilizadas para a prevenção da leptospirose canina contém bactérias completas inativadas que induzem imunidade pela opsonização das bactérias o que resulta na apresentação de antígenos de membrana (lipopolissacarídeo e proteínas de membrana externa). Outras vacinas constituídas por antígenos protéicos da membrana e de subunidades também tem sido investigadas (HAGIWARA, 2003).

As vacinas anti-leptospirose empregadas mundialmente para a imunização dos cães são bacterinas produzidas com estirpes dos sorovares *Icterohaemorrhagiae* e *Canicola*, os mais prevalentes em cães de todo o mundo (HAGIWARA, 2003). Contudo, nos últimos anos, em alguns países, devido ao contato dos cães com reservatórios silvestres ou sinantrópicos ou com o meio ambiente contaminado, pela urina de tais animais (HAGIWARA, 2003) outros sorovares tem sido isolados dos cães domésticos. Isto tem justificado a inclusão de novos sorovares na produção de bacterinas destinadas aos cães. O aumento do número de sorovares também aumenta a possibilidade da ocorrência de reações colaterais indesejáveis tais como as reações de hipersensibilidade (HAGIWARA, 2003). As vacinas contra leptospirose canina devem incluir apenas os sorovares prevalentes na região onde serão utilizadas (HAGIWARA, 2003).

No Brasil, são comercializadas cerca de dez marcas de vacinas contra a leptospirose canina produzidas com sorovares de referência isolados no exterior existindo algumas que incluem até seis sorovares distintos.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar comparativamente a potência de vacinas anti-leptospirose canina comercializadas no Brasil, efetuando o desafio com estirpes de leptospiras autóctones dos sorovares Canicola e Copenhageni.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar comparativamente por marca de vacina e por sorovar, a proteção contra a doença causada por estirpes de leptospiras isoladas no Brasil.

Avaliar comparativamente por marca de vacina e por sorovar, a proteção contra o estabelecimento do estado de portador renal entre os sobreviventes ao desafio com estirpes de leptospiras isoladas no Brasil.

3 REVISÃO DE LITERATURA.

3.1 LEPTOSPIROSE CONCEITO.

A leptospirose é uma zoonose de ampla distribuição geográfica cuja ocorrência em seres humanos pode ser ocupacional. É uma doença febril, aguda, causada por microorganismos do gênero *Leptospira*. A doença foi descrita pela primeira vez em 1880, no Cairo - Egito, por Larrey, no entanto, o quadro febril com icterícia e hemorragia em seres humanos só foi descrita em 1886 por Adolf Weil em Heidelberg - Alemanha (BRASIL, 1989).

No Brasil, os primeiros registros de leptospirose em seres humanos foram efetuados no Rio de Janeiro por Aragão, Bentes e Macdowel, em 1917 (BRASIL, 1989).

A leptospirose é uma doença incluída no grupo de doenças transmissíveis de grande importância do ponto de vista socioeconômico e/ou sanitário, com considerável repercussão no comércio internacional de animais e produtos de origem animal (BLAHA, 1989; OIE, 2008).

3.2 IMPORTÂNCIA EM SAÚDE ANIMAL E SAÚDE PÚBLICA.

O impacto da leptospirose na saúde pública reflete-se no alto custo do tratamento dos seres humanos acometidos e da letalidade da ordem de 5% a 20%. No entanto, as consequências dessa infecção em saúde animal são particularmente da esfera econômica, tendo em vista o envolvimento de bovinos, equínos, suínos, caprinos e ovinos, espécies animais produtoras de alimentos nobres como carne, leite e ainda de produtos de interesse industrial, como lã e couro (BADKE, 2001). No caso dos animais domésticos, de companhia, o prejuízo se dá principalmente no aspecto de saúde pública veterinária (BRASIL, 1989; ALVES, 1991).

A melhoria das ações de controle voltadas aos animais refletirá na diminuição da contaminação ambiental e conseqüentemente, na redução do número de casos humanos de leptospirose (BADKE, 2001). De fato, na leptospirose humana registrada nos países da América Latina, África e Ásia, o maior número de casos ocorre na população de baixo nível sócio econômico, devido a deficiências observadas nas condições do saneamento básico e habitação (FAVERO, 1994).

As diferenças locais, como clima, características ambientais e condições socioeconômicas, são fatores determinantes na epidemiologia da leptospirose (BRANDESPIM, 2003).

A leptospirose também pode estar associada à profissão do indivíduo e ser considerada como uma doença ocupacional para profissionais que trabalham com animais ou têm contato com águas contaminadas (PERROCHEAU; PEROLAT, 1997).

A leptospirose canina é um sério problema de saúde pública veterinária, não só pela sua gravidade, mas também pelo potencial risco de contágio para os seres humanos, devido à estreita relação de convívio estabelecida entre estas espécies (ACHA; SZIFRES, 1996; ACHA; SZIFRES, 2003).

O cão ocupa posição de destaque, por ser considerado o mais importante dos hospedeiros de leptospirosas, após os roedores e pelo contato que mantém com o homem, principalmente nas grandes cidades (YASUDA, 1979).

Murhekar et al. (1998) ao examinarem 1.014 seres humanos da cidade de Diglipur, Índia, pela técnica de soroaglutinação microscópica (SAM) concluíram que 550 (54,2%) eram sororretores para leptospirose e quanto à presença de animais domésticos, observaram que os cães apresentavam a infecção pelo sorovar Grippotyphosa e os bovinos pelo Australis.

Costa, et al. (1985), relataram o caso de um paciente confirmado para leptospirose atendido no Hospital Universitário da Faculdade de Medicina da Universidade

Federal Fluminense, cidade do Rio de Janeiro, em que um cão, portador do sorovar Australis, foi a provável fonte da infecção.

Vasconcelos et al. (1992) examinando 208 indivíduos de diferentes categorias profissionais com risco para contraírem a leptospirose da cidade de Londrina, Paraná, Brasil concluíram que 59 (28,4%) eram positivos, sendo marcante o fato de que quatro pessoas do grupo controle (n=44) que não apresentava risco profissional (estudantes e professores) foram positivas. Com uma investigação mais apurada constataram que dois deles tinham tido contato com cães.

3.3 ETIOLOGIA.

Em novembro de 1914, na universidade imperial de Kyushu no Japão, Inada e colaboradores, observaram pela primeira vez espiroquetas no tecido hepático de um cobaio inoculado com sangue de um paciente acometido pela doença de Weil. Com resultados semelhantes de outros pacientes, que apresentaram a mesma doença, concluíram que o espiroqueta em questão era o agente etiológico daquela patologia e o denominaram de *Spirochaeta icterohaemorrhagiae* (INADA et al., 1916).

Em 1915, Miyajima, isolou do rim de um roedor de campo, *Microtus montebelli*, um espiroqueta que ele considerou igual ao da doença de Weil (MIYAJIMA, 1919/1920). No ano seguinte, Ido e colaboradores relataram o achado do mesmo espiroqueta em ratos domésticos, com a taxa de 40% dentre 86 animais trabalhados. Iniciava-se assim no início do século XX, os estudos sobre roedores como reservatórios de leptospiros (IDO et al., 1917).

Nogushi, estudando o espiroqueta de Inada e estirpes de outras procedências, isoladas do homem e de roedores, propôs a criação do gênero *Leptospira* (do grego Leptos = delgado, spira = novelo) a ser incluída na ordem *Spirochaetales* (NOGUSHI, 1918). Desde 1915 até 1989 a classificação foi baseada em

características culturais, e o gênero *Leptospira* incluía duas espécies, *Leptospira interrogans*, reunindo todas as estirpes patogênicas; e *Leptospira biflexa*, as estirpes saprófitas de vida livre isoladas do ambiente. Para a *Leptospira biflexa* foram descritos mais de 60 sorovares e para a *Leptospira interrogans* mais de 200 (FAINE, 1994; LEVETT, 2001).

Por genotipagem as leptospiros foram reclassificadas em 16 genomespecies, que não correspondem as duas espécies anteriores, já que os sorovares patogênicos e não patogênicos podem ocorrer dentro de uma mesma espécie. As genomespecies aceitas são: *Leptospira interrogans* senso stricto; *Leptospira nogushi*; *Leptospira santarosai*; *Leptospira wolbachii*; *Leptospira meyeri*; *Leptospira biflexa*; *Leptospira fainei*; *Leptospira borgpetersenii*; *Leptospira kirschneri*; *Leptospira weilli*; *Leptospira inadai*; *Leptospira parva*; e *Leptospira alexanderi* (LEVETT, 2001).

Em ausência de parasitismo, as condições ótimas para a sobrevivência das *Leptospiras* são umidade, temperatura de 28°C e pH neutro ou levemente alcalino (PERRY; HEARDY, 2000). Registros experimentais confirmaram até 180 dias de viabilidade de leptospiros em tais condições (BLENDEN, 1976).

3.4 CADEIA EPIDEMIOLÓGICA

As leptospiros podem hospedar-se em diversos grupos de animais vertebrados. No entanto, os mamíferos, principalmente os domesticados, são os que apresentam maior significado epidemiológico. Investigações conduzidas em ecossistemas silvestres, não modificados pela ação humana, referem a presença da infecção em roedores, marsupiais, carnívoros e edentados (BRASIL, 1998). Entretanto, em ecossistemas rurais e urbanos o principal reservatório de leptospiros são os roedores sinantrópicos, entre os quais o *Rattus norvegicus* (ratazana ou rato de esgoto), ocupa em todo mundo uma posição de destaque (BRASIL, 1998). Ressalte-se que neste grupo de animais a relação hospedeiro-parasita revela uma condição de equilíbrio na qual os animais acometidos, usualmente não exteriorizam sinais da infecção e são caracterizados como portadores sadios (VASCONCELLOS, 1987).

3.4.1 Fontes de infecção.

Todos os hospedeiros vertebrados acometidos pela leptospirose podem ser fontes de infecção. São considerados doentes, quando o estado de saúde está alterado e portadores quando não exteriorizam sinais clínicos, porém são capazes de eliminar o microorganismo. Os componentes do ambiente, onde o microorganismo pode persistir viável são vias de transmissão (VASCONCELLOS, 1987).

Qualquer animal que libere leptospiras pela urina (leptospiúria) como roedores, caninos, bovinos, suínos, equínos e bubalinos, tanto os soropositivos como os soronegativos, podem ser fontes de infecção. Os soronegativos assumem importante papel para a saúde pública, pois não são detectados por sorologia, mas albergam e eliminam o agente no meio onde vivem (LARSSON, 1989).

Os animais domésticos portadores de leptospiras são também fontes de infecção para o homem, que pode adquirir a doença, principalmente, por meio do contato com a urina de animais com leptospiúria (BRASIL, 1989).

3.4.2 Reservatórios e portadores.

Os principais reservatórios primários de leptospira são: o rato de esgoto (*Rattus norvegicus*) e o de telhado (*Rattus rattus*). Dentre os vários outros considerados secundários, o cão ocupa posição de destaque, pois além de apresentar um comprometimento clínico grave também é tido como um dos mais importantes hospedeiros de leptospiras, principalmente nas grandes cidades (YASUDA, 1979).

O cão tem papel importante na transmissão da leptospirose ao homem, por manter as leptospiras por longos períodos de tempo em seus rins, podendo eliminá-la na urina sem apresentar sinais clínicos ou após obter a recuperação clínica, portadores convalescentes. Esse fato agrava-se devido aos hábitos domésticos desses animais e de sua estreita relação de convívio com os seres humanos (MAGALHÃES, 2006).

Tesserolli et al. (2008) investigaram os principais sorovares causadores da leptospirose canina na cidade de Curitiba, PR. No período de 01 de janeiro a 31 de dezembro de 2007, foram examinados 598 cães de ambos os sexos e de diferentes raças e idades. O diagnóstico da leptospirose foi efetuado pela técnica de SAM com uma coleção de nove sorovares. Das 598 amostras, 193 (32,27%) foram reagentes e os sorovares predominantes foram: Copenhageni (71,50%), Canicola (6,74%) e Icterohaemorrhagiae (2,08%). Alguns cães apresentaram infecções mistas: Copenhageni e Icterohaemorrhagiae (10,36%), Copenhageni e Canicola (7,76%), Canicola, Copenhageni e Icterohaemorrhagiae (1,04%), Canicola e Icterohaemorrhagiae (0,52%).

Blazius et al. (2005) investigaram a ocorrência de infecção por *Leptospira* spp. em cães errantes de Itapema, SC, Brasil. Amostras de soro de 590 cães de rua foram testadas contra 25 sorovares de *Leptospira* spp. pelo teste de SAM. O sorovar mais frequente foi o Pyrogenes com 26 (18,0%) animais positivos, seguido dos sorovares Canicola 20 (13,8%), Icterohaemorrhagiae e Copenhageni 18 (12,5%), com títulos de anticorpos variando de 100 a 3.200. Considerável participação (10,4-11,1%) também foi detectada para os sorovares Castellonis, Butembo e Grippothyphosa.

Batista et al. (2005) investigaram a prevalência de leptospirose em cães da cidade de Campina Grande, PB, Brasil. Foram examinados 285 animais em amostras de soro sanguíneo colhidas durante a campanha de vacinação anti-rábica animal. A prevalência encontrada foi de 21,4% com maior frequência dos sorovares Autumnalis (7,4%), Copenhageni (6%) e Canicola (2,1%).

Os cães, depois dos roedores, são considerados como a segunda principal fonte de infecção para o homem, sendo os hospedeiros preferenciais do sorovar Canicola. Em populações não vacinadas, a incidência de infecção por este sorovar pode variar de 50 a 75% (BOLIN, 1996). Os ratos são os hospedeiros do sorovar Icterohaemorrhagiae, mas os cães são frequentemente hospedeiros acidentais desta sorovariedade (FAINE et al., 1999). A presença de cães errantes nos municípios brasileiros preocupa o serviço de saúde pública quanto ao papel desempenhado por estes animais como fontes de infecção de doenças comuns ao homem e aos animais, sendo indicado o seu recolhimento bem como a educação e

conscientização da população para a posse responsável dos animais de companhia (BRIHUEGA; HUTTER, 1994).

A prevalência da leptospirose em cães varia consideravelmente entre áreas e entre países, sendo mais elevada em regiões tropicais onde os sorovares Icterohaemorrhagiae e Canicola são os mais comumente associados à leptospirose canina (BRIHUEGA; HUTTER, 1994).

Reações sorológicas para as variantes sorológicas Copenhageni e Icterohaemorrhagiae foram encontradas em alta frequência em cães na cidade de Pelotas (RS) (ÁVILA et al., 1998; MASCOLLI et al., 2002). Dos sorovares prevalentes descritos no Brasil, reações sorológicas para o sorovar Icterohaemorrhagiae foram observadas em mais de 50% dos casos nas cidades de Recife, Salvador e São Paulo (ROMERO et al., 2003; SILVA et al., 2003) e associado ao sorovar Canicola foi o que apresentou os maiores títulos de anticorpos em casos de leptospirose humana na cidade de Belo Horizonte.

Os principais reservatórios de *Leptospira* são roedores sinantrópicos das espécies *Rattus norvegicus*, *Rattus rattus* e *Mus musculus* (BRASIL, 2002) Contudo, cães errantes, presentes em municípios do Brasil, são importantes fontes de infecção para o homem. (FREITAS et al., 2004; BATISTA et al., 2005; BLAZIUS et al., 2005; BROWN et al., 2008).

Em áreas rurais, o cão exerce também um importante papel na cadeia de transmissão. Mas, outros animais de produção, como bovinos, suínos, equinos, bubalinos, caprinos e ovinos, são suscetíveis à infecção e participam da transmissão da doença por meio do contato dessas espécies com trabalhadores do setor agropecuário (VASCONCELLOS, 2000; HOMEM et al., 2001).

3.4.3 Vias de eliminação.

As leptospiros são eliminadas na urina, de forma intermitente, podendo persistir por períodos de tempo de longa duração, variáveis com as espécies animais e a variante sorológica envolvida; nos roedores, a presença de leptospiros na urina pode ser permanente (ELLIS, 1994)

Nos animais de produção também ocorre a eliminação das leptospiros pelo sêmen e corrimentos vaginais (ELLIS, 1994). A uretra é uma via comum para eliminação de urina e sêmen, este último também pode apresentar leptospiros, o que torna possível a transmissão venérea da leptospirose animal, tanto pela monta natural, como por inseminação artificial (BRASIL, 1998).

3.4.4 – Fatores condicionantes.

Vasconcellos (1987) ponderou que a extensão ou duração de um foco de leptospirose não depende apenas da existência de hospedeiros, animais doentes ou portadores, mas necessita também da participação de alguns fatores ditos condicionantes, que facilitam a veiculação dos microorganismos até os animais suscetíveis. Merece destaque: a densidade demográfica das populações e particularmente o pH e o grau de umidade do solo e de água onde a urina contaminada é depositada. Destaca-se ainda que, além dos aspectos biológicos e físicos que influenciam a ocorrência da leptospirose devem também ser salientados os fatores da esfera administrativa, onde os órgãos executores de saúde pública, que organizam e devem oferecer estes serviços à comunidade, nem sempre o fazem de uma forma satisfatória para mitigar a expansão da doença.

3.5 PATOGENIA.

A patogenia da leptospirose inclui a penetração ativa dos microorganismos pelas mucosas (ocular, digestiva, respiratória, e genital), pele escarificada e inclusive pele íntegra em condições especiais que favoreçam a dilatação dos poros, como ocorre quando da permanência por tempo prolongado em coleções de água contaminada (BRASIL, 1998; LILENBAUM, 2000).

Após a penetração no organismo do hospedeiro suscetível, as leptospiras disseminam-se pela corrente sanguínea (CORREA; CORREA, 1992), surgindo pequenas lesões vasculares devido a própria ação das bactérias, que podem levar a sangramentos e formação de pequenos trombos, que promovem áreas de enfarto por bloqueio do fluxo de sangue (FAINE, 1994)

No período de leptospiremia, as leptospiras disseminam-se por vários órgãos, como sistema nervoso central, olhos e trato genital, mas há uma predileção pelo fígado, baço e rins (GREENE, 1998). Este período, com duração, variável, de dois dias a uma semana, é caracterizado por discreta febre (FAINE, 1999). Se o animal sobrevive a fase inicial, seu sistema imunitário reage com a produção de anticorpos específicos, observáveis na maioria dos casos já no final da primeira semana após a infecção (GUIMARÃES et al., 1982/83; PIMENTEL, 1999). Nesta oportunidade, as leptospiras presentes na circulação e nos tecidos são praticamente destruídas. Os microorganismos que conseguem escapar à reação do organismo migram para as áreas onde a imunidade humoral não existe ou é verificada em níveis bastante baixos, como a câmara anterior do globo ocular e a luz dos túbulos contornados renais (VASCONCELLOS, 1987). Nestes locais as leptospiras podem permanecer por longos períodos (FAINE, 1999).

As lesões de uveítes e nefrites intersticiais crônicas podem ocorrer na fase crônica da leptospirose devido à deposição de imunocomplexos *in vitro* que provocam reações de hipersensibilidade do tipo III (TURNER, 1967).

Nos cães, os sintomas da leptospirose durante a leptospiremia são: febre, mucosas hipocoradas, anorexia, letargia, fraqueza muscular, vômitos, desidratação, dores

musculares e diarreia (GREENE et al., 1998; RENTKO et al., 1992; WHOL, 1996; DZIEZYC, 2000; MCDONOUGH, 2001).

As duas formas clínicas da leptospirose mais observadas em cães são:

Hepatonefrites – comprometimento hepático e renal causada pelo sorovar Icterohaemorrhagiae – doença hemorrágica aguda que pode levar a óbito em 24 a 28 horas por falência hepática e renal severas, caracterizadas por icterícia e uremia, podendo ainda haver a forma anictérica (KOGIKA et al., 1992) da doença com grave comprometimento renal;

Nefrite – comprometimento renal, causado pelo sorovar *Canicola* – desenvolvimento nos casos mais graves de insuficiência hepática e uremia, que se traduz em gastroenterite urêmica, estomatite e glossite (MASCOLLI, 2001); enquanto que nos “benignos” ocorre nefrite intersticial crônica com eliminação de leptospiras por longos períodos de tempo.

Os sorovares Grippotyphosa, Pomona, Autumnalis, Bataviae também podem causar manifestações clínicas em cães, semelhantes as provocadas pelos sorovares Icterohaemorrhagiae e Canicola, porém o mais comum são as formas anictéricas (PRESCOTT et al, 1991; HARKIN et al, 1996; BROWN et al., 1996; WARD et al, 2002).

3.6 DIAGNÓSTICO.

O diagnóstico de leptospirose pode ser realizado por diferentes métodos laboratoriais baseados na detecção direta ou indireta do agente ou do seu material genético (SANTA ROSA, 1970; FAINE et al 1999).

3.6.1 Métodos diretos de detecção do agente.

- Microscopia de campo escuro: aplicada ao exame de sangue ou urina a fresco. Exige experiência profissional do pessoal que irá realizar o exame e possui baixa sensibilidade e especificidade (BOLIN, 1996; LEVETT, 2001; MCDONOUGH, 2001);
- Imunofluorescência direta: também dependente de técnicos treinados e é efetuada com sangue, sedimentos urinários e tecidos (BOLIN, 1996);
- Colorações pela prata: aplicadas em esfregaços de sangue ou macerado de órgãos, que permitem a visualização das leptospiras em campo claro, mas possuem baixa sensibilidade, principalmente em animais com infecção crônica que apresentam poucas bactérias (BOLIN, 1996);
- Inoculação em animais de laboratório: são efetuadas pela via intraperitoneal, o hamster é o animal de escolha devido a sua alta sensibilidade apresentando usualmente evolução fatal em menos de dez dias (CORREA; CORREA, 1992);
- Métodos de cultivo: o sangue deve ser utilizado quando colhido durante a bacteremia, já a urina tem seu período ideal após 15 dias da infecção. O período de crescimento é longo e os meios de cultura são específicos, como o meio sintético de Fletcher, que exige, no mínimo, seis semanas de incubação (CORREA; CORREA, 1992);
- Reação de polimerase em cadeia (PCR): nesse método a detecção das leptospiras é efetuada pelos elementos do seu DNA, possui sensibilidade e especificidade elevadas (HARKIN, 2003), porém pode apresentar reações cruzadas com leptospiras saprófitas e não possibilita a identificação dos sorovares ou sorogrupos (BOLIN, 1996).

3.6.2 – Métodos indiretos de detecção do agente.

Os métodos de laboratório indiretos são aqueles que revelam os anticorpos produzidos pelo hospedeiro devido à infecção pelas leptospiros. Existem vários testes: provas de soraglutinação (macroscópica, microscópica, aglutinação em látex, hemaglutinação). A SAM é o método de referência preconizado pela Organização Mundial da Saúde (FAINE et al., 1999). Para a sua realização é necessário uma infra-estrutura mínima e pessoal qualificado (SMITH et al., 1994). Esse teste é baseado principalmente na reação entre antígenos encontrados na superfície da leptospiros com anticorpos contra tais antígenos (BALDWIN et al., 1987). Os epítomos de lipopolissacarídeos (LPS) presentes na superfície das leptospiros são os principais antígenos que reagem com os anticorpos produzidos após a infecção natural ou experimental (FAINE, 1994). Estes anticorpos são a base do diagnóstico para os testes sorológicos. As coleções de antígenos devem conter pelo menos um representante por sorogrupo, e se possível, algumas estirpes locais (FAINE et al., 1999) pois os títulos obtidos com estirpes locais são geralmente mais altos que os encontrados com os sorovares de referência do mesmo sorogrupo (LEVETT, 2001; OLIVEIRA, 2003). A SAM é um teste considerado sorogrupo específico e a sua interpretação é complexa devido às reações cruzadas que ocorrem entre sorogrupos distintos, principalmente na fase aguda da doença (RENTKO, 1992; FAINE, 1994). A especificidade da SAM é alta, entretanto a sensibilidade declina à medida que aumenta o tempo decorrido após a infecção. Uma limitação da SAM aplicada ao diagnóstico da leptospirose é o fato da resposta humoral não ser acionada em intensidade suficiente para ser detectada no exame na primeira semana da infecção, de modo que uma doença aguda seguida de morte pode ser negativa ao teste sorológico (BOLIN, 1996).

A imunidade ativa induzida pela imunização leva a produção de anticorpos aglutinantes sorovares específicos contra antígenos presentes nas vacinas. Embora tais anticorpos persistam, de maneira geral, por poucos meses na corrente

sanguínea, nesse período podem ser detectados na SAM e interferir com o diagnóstico (BEY et al., 1982; GREENE, 1998; LANGONI, 2002)

3.7 PROFILAXIA.

As medidas de profilaxia empregadas ao controle e prevenção da leptospirose devem ser dirigidas para os três elos da cadeia epidemiológica: fontes de infecção, vias de transmissão e suscetíveis.

As fontes de infecção representadas por animais domésticos e de produção devem ser tratadas para sustar a eliminação de bactérias e contaminação ambiental. No caso dos roedores sinantrópicos, o que deve ser feito é o controle de suas populações, tanto no meio rural, como no urbano (FURTADO et al., 1997; JOUGLARD et al., 2000; HOMEM et al., 2001; MASCOLLI et al., 2002). No combate aos roedores sinantrópicos, são destacadas medidas de anti-ratização e a desratização (CARVALHO NETO, 1986).

No relativo as vias de transmissão, o que mais se destaca é o saneamento básico, tanto nas grandes cidades quanto na zona rural; nesta última um cuidado especial deve ser tomado com o destino dos restos de abortamento dos animais de produção, evitando-se que os cães tenham contato com esses materiais ou que ocorra a sua interação com animais silvestres portadores de leptospiras. Outros pontos importantes vão desde a colheita e destinação adequada de lixo até a implantação de estratégias de saneamento ambiental que previnam a ocorrência de enchentes (BRASIL, 2005).

No caso de seres humanos o controle apóia-se no uso de botas, de luvas e no esclarecimento das pessoas que praticam esportes de risco, sobre as formas de

contágio da doença. A leptospirose humana é conhecida também como doença dos plantadores de arroz ou doença dos criadores de suínos, nesses casos a orientação para o uso de botas e luvas apropriadas contribuirá, em muito para a prevenção da doença (BRASIL, 2005).

O controle da leptospirose envolve a aplicação de medidas que incluem a identificação das fontes de infecção, a drenagem do excesso de água do ambiente, o tratamento de animais infectados e a imunização sistemática dos animais suscetíveis, com vacinas inativadas que contenham os sorovares presentes na região (GUIMARÃES et al., 1982, 1983; FAINE et al., 1999). Em todo o mundo a leptospirose animal tem sido controlada com o emprego de vacinação (ELLIS, 1986).

Na área de medicina veterinária as vacinas disponíveis comercialmente para o controle da leptospirose são constituídas por bactérias completas inativadas (bacterinas) ou em preparados da membrana externa do microorganismo (PENA MOCTEZUMA et al., 1999).

A imunoprevenção da leptospirose é efetuada com vacinas inativadas, produzidas com sorovares escolhidos entre os mais frequentes de determinada região ou país (THIERMANN, 1984b). O mercado brasileiro dispõe de bacterinas anti-leptospirose canina contendo até seis ou mais sorovares: Pomona, Icterohaemorrhagiae, Hardjo, Canicola, Wolffi, Grippotyphosa e Bratislava, incluindo ou não adjuvantes como o hidróxido de alumínio (SINDAN, 1997). A efetividade destas vacinas é altamente questionável, pois além de baixa produção de anticorpos, dificilmente são produzidas com estirpes locais (FAINE, 1994).

O número de sorovares incluídos nas bacterinas decorre do fato da proteção oferecida ser sorovar específica, não havendo imunidade de forma cruzada consistente de sorovares distintos, o que justifica a formulação das bacterinas de acordo com a soroprevalência regional (FREUDENSTEIN, 1991).

Embora já presente em algumas vacinas contra leptopirose canina, comercializadas no Brasil o sorovar Copenhageni ainda não está incluído na maioria das bacterinas existentes, porém, é o que mais tem sido isolado em cães no país (AVILA, 1998; JOUGLARD, 1999; MASCOLLI, 2001; FAVERO, 2002).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 350 hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos jovens, com 60 a 100 gramas de peso vivo. Durante o experimento os animais foram distribuídos e mantidos em caixas de polipropileno, equilibrando-se os pesos nos grupos de modo torná-los homogêneos. As caixas foram forradas com maravalha e os animais receberam água de rede pública e ração comercial peletizada balanceada *ad libitum*.

4.2 BACTERINA

Foram utilizadas nove bacterinas comerciais polivalentes anti-leptospirose canina comercializadas no Brasil, identificadas respectivamente pelas letras A, B, C, D, E, F, G, H e I. Vacina **A** – fração liofilizada: vacina recombinante contra cinomose, hepatite, adenovirus tipo 2, parvovirose, parainfluenza e fração líquida: coronavirose e culturas de leptospirose canina sorovares Canicola e Icterohaemorrhagiae inativadas e isenta de adjuvante; vacina **B** – fração liofilizada: vacina associada dos vírus contra cinomose, hepatite infecciosa canina, adenovirus tipo 2, parainfluenza e parvovirose e fração líquida: concentrado lisado de leptospiros sorovares Canicola, Copenhageni, Grippotiphosa, Icterohaemorrhagiae e Pomona, ressuspendidas no antígeno de Coronavirus, inativado; vacina **C** – fração liofilizada: vacina contra cinomose, adenovirus tipo 2, parainfluenza, parvovirose, leptospiros sorovares Canicola, Grippotiphosa, Icterohaemorrhagiae e Pomona e fração líquida: diluente é uma preparação líquida da vacina de coronavirus inativado contendo adjuvante; vacina **D** - fração liofilizada: vacina composta de suspensões virais vivas atenuadas

de cinomose, adenovirus tipo 2, parvovirus e parainfluenza canina e fração líquida: composta pela associação da suspensão viral inativada de coronavírus e suspensões bacterianas inativadas de leptospiras sorovares Canicola e Icterohaemorrhagiae; vacina **E** - Fração liofilizada: vacina composta de suspensões virais vivas atenuadas de cinomose, adenovirus tipo 2, parvovirus e parainfluenza canina e fração líquida: composta pela associação da suspensão viral inativada de Coronavírus e suspensões bacterianas inativadas de leptospiras sorovares Canicola, Copenhageni, Grippotiphosa, Icterohaemorrhagiae e Pomona; vacina **F** – vacina líquida inativada contra leptospirose canina sorovares Canicola, Grippotiphosa, Icterohaemorrhagiae e Pomona; vacina **G** – fração liofilizada: composta por vírus da cinomose canina, adenovirus tipo 2 e parvovirus canino, todas homologas e atenuadas e fração líquida: diluente preparado a partir de leptospiras sorovares Canicola e Icterohaemorrhagiae inativadas quimicamente; vacina **H** – vacina líquida preparada a partir de leptospiras sorovares Canicola e Icterohaemorrhagiae inativadas quimicamente; vacina **I** - fração liofilizada: vacina associada dos vírus contra cinomose, hepatite infecciosa canina, adenovirus tipo 2, parainfluenza e parvovirose e fração líquida: concentrado lisado de leptospiras Sorovares Canicola, Copenhageni, Grippotiphosa, Icterohaemorrhagiae e Pomona, ressuspendidas no antígeno de Coronavírus, inativado. **Controle** – não vacinado, apenas desafiado com os sorovares Canicola LO₄ e Copenhageni L₁-130.

4.3 ESTIRPES DE DESAFIO.

Foram utilizadas estirpes de leptospiras isoladas no Brasil, L₁-130 do sorovar Copenhageni, amostra FIOCRUZ que foi isolada de um paciente com quadro grave de leptospirose durante um surto epidêmico em 1996 na cidade de Salvador, BA, Brasil (KO et al., 1999; NASCIMENTO et al., 2004) e LO₄ do sorovar Canicola isolada dos fragmentos de fígado de suíno abatido em matadouro da cidade de Londrina, PR, Brasil pela equipe do Laboratório de leptospirose do Departamento de Medicina Veterinária preventiva (DMVP) da Universidade Estadual de Londrina (UEL) PR (FREITAS et al., 2004). As duas estirpes foram tipificadas com conjuntos

de anticorpos monoclonais produzidos pelo Royal Tropical Institute de Amsterdam, Holanda, centro de referencia para leptospirose da OMS.

O inóculo de desafio da estirpe LO₄ foi a suspensão do tecido hepático de hamster previamente infectado. O macerado foi preparado em meio líquido EMJH¹ na proporção 1:10 (peso/volume). Foram efetuadas diluições seriadas de razão dez de 10⁻⁵ à 10⁻¹⁹. Para a titulação foram empregados 80 hamsters subdivididos em grupos de cinco. Cada grupo foi inoculado com uma das diluições no volume de 200µl/hamster via intraperitoneal. Os animais foram observados por 21 dias e o cálculo da dose letal (DL 50) empregou o método de Reed e Muench (1938). A diluição empregada no desafio foi a de 10⁻⁶.

O inóculo de desafio da estirpe L₁-130 foi uma cultura em meio EMJH de 15 dias primeira passagem. Foram efetuadas diluições seriadas de razão dez de 10⁻³ à 10⁻¹⁶. Para a titulação foram empregados 75 hamsters subdivididos em grupos de cinco. Cada grupo foi inoculado com uma das diluições no volume de 200µl/hamster via intraperitoneal. Os animais foram observados por 21 dias e o cálculo da dose letal (DL 50) empregou o método de Reed Muench (1938). A diluição empregada no desafio foi a de 10⁻⁴.

4.4 DESAFIO EM HAMSTER.

O teste de potência foi realizado conforme a norma americana *Code Federal Regulation* (9 CFR 113-103, 2006).

A vacina foi diluída a 1:80 da dose recomendada para cães pelo respectivo fabricante.

Os hamsters utilizados foram distribuídos em 20 grupos de dez animais: (1) grupo vacinado com bacterina A e desafiado com LO₄; (2) grupo vacinado com bacterina A

¹ Ellinghausen-McCullough-Jonhson-Harris (DIFCO-Detroit, EUA)

e desafiado com L₁-130; (3) grupo vacinado com bacterina B e desafiado com LO₄; (4) grupo vacinado com bacterina B e desafiado com L₁-130; (5) grupo vacinado com bacterina C e desafiado com LO₄; (6) grupo vacinado com bacterina C e desafiado com L₁-130; (7) grupo vacinado com bacterina D e desafiado com LO₄; (8) grupo vacinado com bacterina D e desafiado com L₁-130; (9) grupo vacinado com bacterina E e desafiado com LO₄; (10) grupo vacinado com bacterina E e desafiado com L₁-130; (11) grupo vacinado com bacterina F e desafiado com LO₄; (12) grupo vacinado com bacterina F e desafiado com L₁-130; (13) grupo vacinado com bacterina G e desafiado com LO₄; (14) grupo vacinado com bacterina G e desafiado com L₁-130; (15) grupo vacinado com bacterina H e desafiado com LO₄; (16) grupo vacinado com bacterina H e desafiado com L₁-130; (17) grupo vacinado com bacterina I e desafiado com LO₄; (18) grupo vacinado com bacterina I e desafiado com L₁-130; (19) grupo controle, não vacinado e desafiado com LO₄; (20) grupo controle não vacinado e desafiado com L₁-130. Cada grupo, recebeu uma dose de 0,25 mL do respectivo inoculo de desafio da bacterina, pela via subcutânea. Após 14 dias, todos os animais foram desafiados com culturas vivas dos sorovares Copenhageni L₁-130 e Canicola LO₄ pela via intraperitoneal.

Os animais foram observados por 21 dias consecutivos, contabilizando-se os que morreram por leptospirose caracterizada por: emagrecimento, hemorragias pelos orifícios naturais, icterícia, hepato e esplenomegalia bem como petéquias e sufusões pulmonares. Ao final deste período, os animais que sobreviveram ao desafio foram submetidos à eutanásia por inalação de gás carbônico (câmara de CO₂), e necropsiados para colheita dos rins e realização de cultivos destinados ao controle de infecção renal por leptospirosas.

4.5 ISOLAMENTO DE LEPTOSPIRAS PARA O CONTROLE DE ESTADO DE PORTADOR RENAL.

Aos 21 dias pós-infecção (d.p.i) por leptospiras, os hamsters sobreviventes foram anestesiados em câmara de CO₂ e, após sangria destinada a SAM, foram submetidos à eutanásia com o aprofundamento da anestesia. Os animais foram necropsiados e seus rins foram colhidos assepticamente, macerados e adicionada quantidade suficiente de solução salina tamponada para a obtenção da diluição inicial a 10⁻¹, a partir da qual foram preparadas duas diluições seriadas em escala geométrica de razão dez (10⁻², 10⁻³). Cem microlitros por diluição foram semeados em tubos com tampa de baquelite contendo 5,0 ml de meio semi-sólido de Fletcher (MYERS, 1985), dois tubos por diluição, os quais foram incubados em estufa 28-30°C por seis semanas, com observações semanais (FAVERO et al., 1997) para à verificação da formação do anel de crescimento sub-superficial (Zona de Dinger) de leptospiras no meio (MYERS, 1985) ao qual foi confirmado pela constatação efetiva de leptospiras em microscopia de campo escuro.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.

O resultado obtido nos hamsters foi analisado pelo Critério preconizado no Teste de Potência para bacterinas seguindo as normas técnicas americanas, proposto pelo *Code Federal Regulation*,(9 CFR 113.103, 2006).

5 RESULTADOS.

Os resultados obtidos segundo a metodologia empregada estão descritos a seguir:

5.1 TITULAÇÃO DO INÓCULO INFECTANTE DE DESAFIO.

No transcorrer do período de 21 dias, após a inoculação, foram observados óbitos de animais nas diluições 10^{-5} a 10^{-10} para o sorovar Canicola LO₄, e de 10^{-3} a 10^{-9} para o sorovar Copenhageni L₁ 130 (Tabela 1). A titulação dos inoculos de desafio utilizados foi efetuada com o emprego do Método de Reed e Muench (1938) e os números de doses letais 50% efetivamente empregadas foram de 10.000 e 5,4 respectivamente para as estirpes LO₄ e L₁-130.

Tabela 1 - Hamsters infectados com estirpes de leptospiras patogênicas segundo a diluição do inoculo infeccioso, a estirpe de leptospira e a proporção de mortes por leptospirose - São Paulo - 2010

Diluição	Estirpes	
	LO ₄ - sorovar Canicola	L1-130, sorovar Copenhageni
10 ⁻³	...	4/5*
10 ⁻⁴	...	8/10
10 ⁻⁵	5/5	0/5
10 ⁻⁶	9/10	1/5
10 ⁻⁷	5/5	2/5
10 ⁻⁸	5/5	1/5
10 ⁻⁹	5/5	1/5
10 ⁻¹⁰	3/5	0/5
10 ⁻¹¹	0/5	...
10 ⁻¹²	0/5	...

*Número de mortes por leptospirose/ número de inoculados, ...= não realizado
 Diluição utilizada no desafio LO₄ = 10⁻⁶, L₁130 = 10⁻⁴, DL 50 titulação LO₄ = 10⁻¹⁰,
 L₁130 = 10^{-4,7}, número DL 50 efetivamente empregadas = LO₄ = 10.000, L₁130= 5,4.

5.2 PROTEÇÃO CONTRA A DOENÇA.

A tabela 2 apresenta os resultados do teste de desafio em hamsters para as nove bacterinas comerciais anti-leptospirose avaliadas. Os resultados observados referem-se à proporção de hamsters sobreviventes ao desafio com o sorovar Canicola LO₄. No grupo controle do inoculo infectante de desafio houve um animal sobrevivente em dez inoculados com o sorovar Canicola LO₄, enquanto nos grupos vacinados e desafiados com este sorovar as proporções de sobreviventes foram 10/10 para vacina A, 0/10 para vacina B, 9/10 para vacina C, 0/10 para vacina D, 0/10 para vacina E, 3/10 para vacina F, 7/10 para vacina G, 5/10 para vacina H e 0/10 para vacina I. Portanto, de acordo com o critério de aprovação adotado de ocorrerem no máximo duas mortes por leptospirose em dez animais desafiados, só foram aprovadas as bacterinas A e C. As bacterinas G e H ainda poderiam ser objeto de um reteste para ser verificado se as proporções de mortes ficaria no máximo em cinco mortes de vinte animais desafiados, por bacterina.

Tabela 2 - Hamsters imunizados com vacinas comerciais anti-leptospirose canina e desafiados com a estirpe de leptospira autóctone LO₄ do sorovar Canicola, segundo o código de identificação da bacterina e a proporção de animais sobreviventes aos 21 dias de desafio - São Paulo - 2010.

Bacterina	Proporção de sobreviventes
A	10/10*
B	0/10
C	9/10
D	0/10
E	0/10
F	3/10
G	7/10
H	5/10
I	0/10
Controle (não vacinado)	1/10

*Número de animais vivos/número de animais desafiados

A tabela 3 apresenta os resultados do teste de desafio em hamsters para as nove bacterinas comerciais anti-leptospirose avaliadas. Os resultados observados referem-se à proporção de hamsters sobreviventes ao desafio com a estirpe L₁-130 do sorovar Copenhageni. No grupo controle do inoculo infectante de desafio houve dois animais sobreviventes em dez inoculados, enquanto nos grupos vacinados e desafiados as proporções foram 8/10 para vacina A, 3/10 para vacina B, 8/10 para vacina C, 4/10 para vacina D, 3/10 para vacina E, 6/10 para vacina F, 6/10 para vacina G, 6/10 para vacina H e 4/10 para vacina I. Portanto, de acordo com o critério de aprovação empregado, de ocorrer no máximo duas mortes por leptospirose em dez animais desafiados, só foram aprovadas as bacterinas A e C. As bacterinas F, G e H ainda poderiam ser retestadas para que fosse verificado se o número de mortes atingido seria de no máximo cinco em vinte animais desafiados por bacterina.

Tabela 3 - Hamsters imunizados com vacinas comerciais anti-leptospirose canina desafiados com estirpe L₁-130 de leptospira autóctone do sorovar Copenhageni segundo o código de identificação da bacterina e a proporção de animais sobreviventes aos 21 dias do desafio - São Paulo - 2010.

Bacterina	Proporção de sobreviventes
A	8/10*
B	3/10
C	8/10
D	4/10
E	3/10
F	6/10
G	6/10
H	6/10
I	4/10
Controle (não vacinado)	2/10

*Número de animais vivos/número de animais desafiados.

A figura 1 demonstra o desempenho das vacinas frente aos inoculos de desafio em relação a porcentagem dos animais sobrevivente desafiados com as estirpes LO₄ e L₁ 130.

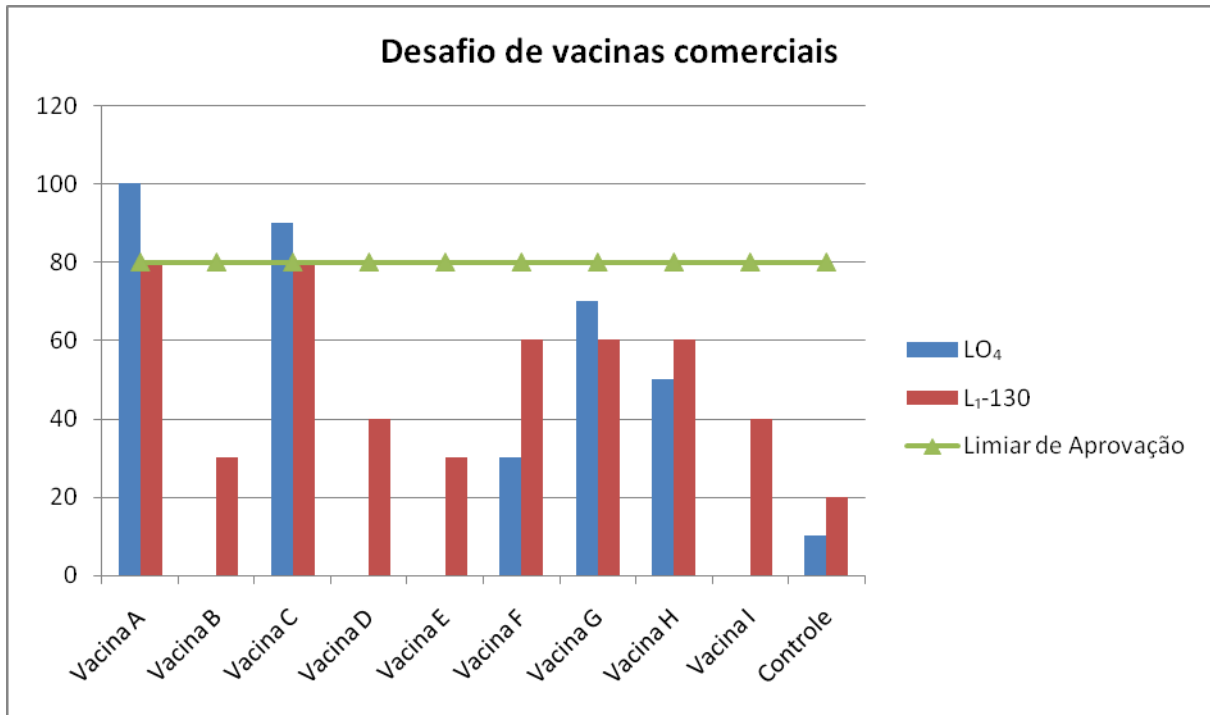


Figura 1- Hamsters imunizados com vacinas comerciais anti-leptospirose canina e desafiados com estirpes autóctones dos sorovares Canicola LO₄ e Copenhageni L₁-130, segundo o código de identificação da bacterina e a proporção de sobreviventes aos 21 dias do desafio, expresso em porcentagem - São Paulo - 2010

5.3 PROTEÇÃO CONTRA INFECÇÃO.

Na tabela 4, são apresentadas as proporções de hamsters sobreviventes ao desafio com as estirpes LO₄ e L₁-130 vacinados com bacterinas comerciais que apresentaram estado de portadores renais, confirmado pelo isolamento de leptospiros nos cultivos de tecido renal em meio semi-sólido de Fletcher.

Tabela 4 - Proporção de hamsters imunizados com bacterinas anti-leptospirose canina e sobreviventes ao desafio com leptospiros patogênicos, caracterizados como portadores renais de leptospiros aos 21 dias do desafio segundo o código de identificação da bacterina e a estirpe de desafio empregada - São Paulo - 2010

Vacina	Sorovar Canicola, estirpe LO₄.	Sorovar Copenhageni, estirpe L₁- 130
<u>A</u>	0/10*	5/8
<u>B</u>	...	3/3
<u>C</u>	1/9	3/8
<u>D</u>	...	4/4
<u>E</u>	...	3/3
<u>F</u>	1/3	5/6
<u>G</u>	0/7	5/6
<u>H</u>	0/5	5/6
<u>I</u>	...	4/4
Controle (não vacinado)	0/1	2/2

...- não realizado, *- número de animais cultivo renal positivos para leptospirose/ número de animais que sobreviveram ao desafio

A figura 2 apresenta simultaneamente as proporções de hamsters que sobreviveram ao desafio e o percentual de sobreviventes caracterizados como portadores renais de leptospiras nos desafios efetuados com a estirpe LO₄ do sorovar Canicola

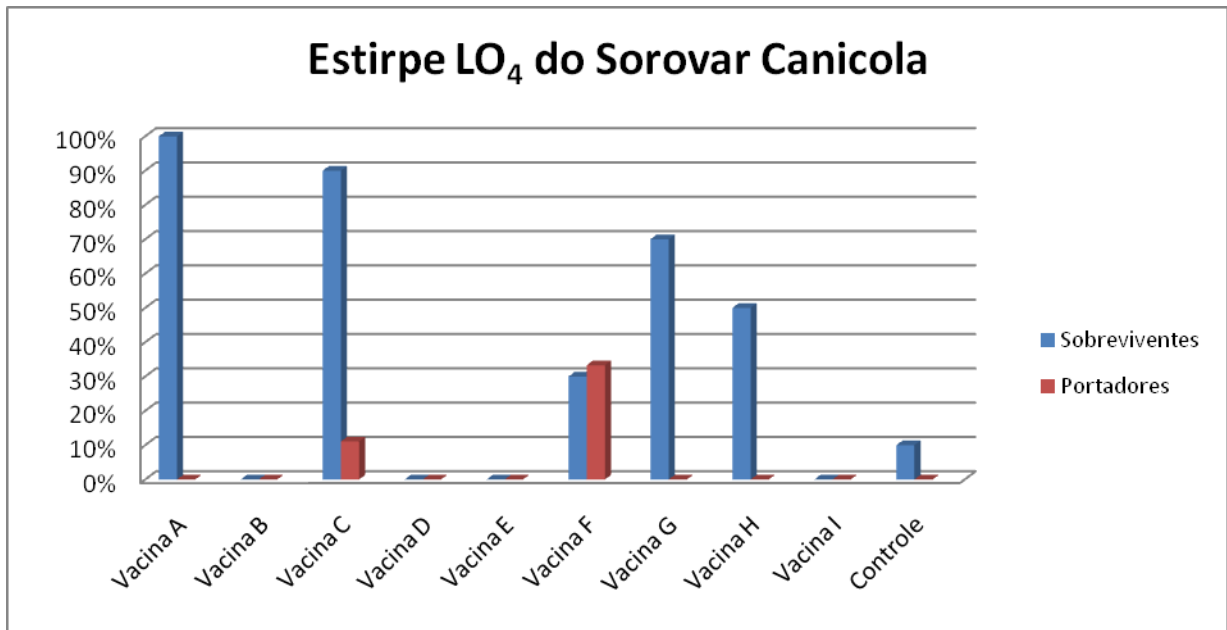


Figura 2 - Proporção de hamsters imunizados com bacterinas anti-leptospirose canina que sobreviveram ao desafio e de animais caracterizados como portadores renais de leptospiras aos 21 dias do desafio, segundo o código de identificação da bacterina empregada - São Paulo - 2010

A figura 3 apresenta simultaneamente as proporções de hamsters que sobreviveram ao desafio e o percentual de sobreviventes caracterizados como portadores renais de leptospiros nos desafios efetuados com o sorovar Copenhageni L₁-130

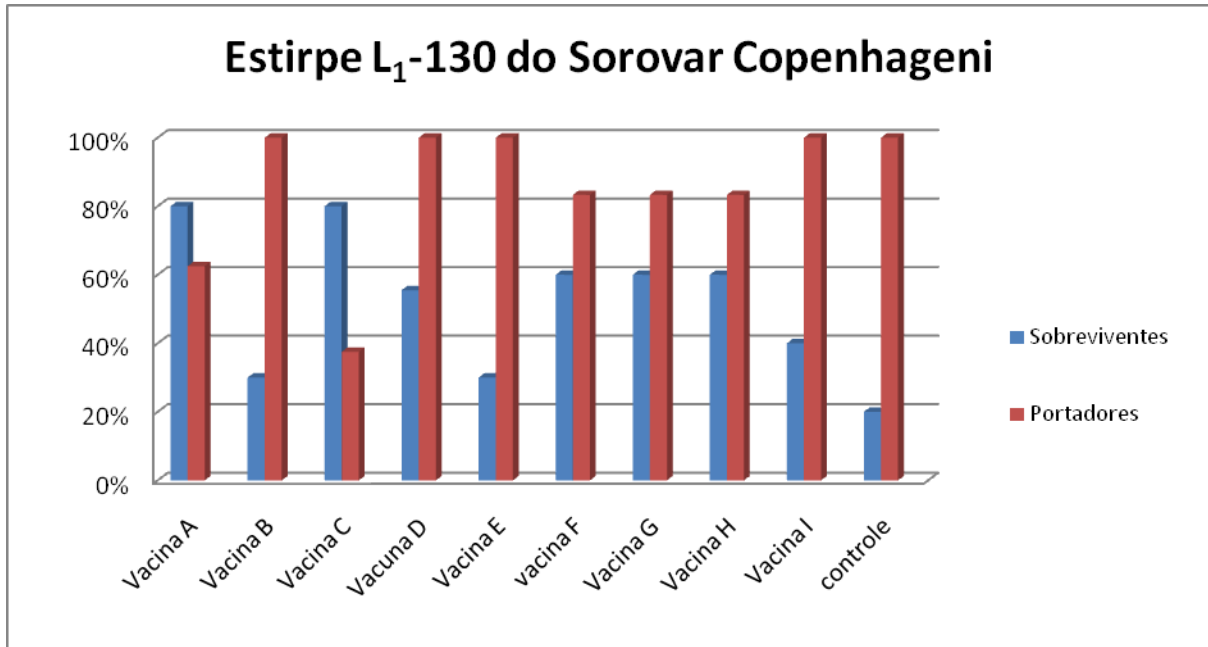


Figura 3 – Proporção de hamsters imunizados com bacterinas anti-leptospirose canina que sobreviveram ao desafio e de animais caracterizados como portadores renais de leptospiros aos 21 dias do desafio, segundo o código de identificação da bacterina empregada - São Paulo - 2010

6 DISCUSSÃO

Das nove vacinas comerciais testadas, foram observados resultados distintos, na resposta vacinal avaliada tanto pelo número de animais sobreviventes ao desafio como pelo número de animais sobreviventes porém, caracterizados como portadores renais de leptospiros.

O teste de potência anti-leptospirose preconizado pelo Ministério da Agricultura dos Estados Unidos (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 1977) considera a vacina aprovada quando a proporção de mortes por leptospirose no grupo controle não vacinado for igual ou superior a 8/10 e, no grupo vacinado, essa proporção não seja superior a 2/10 ou 5/20.

Os resultados do teste de desafio com os sorovares Canicola estirpe LO₄ e Copenhageni estirpe L₁-130 em hamsters vacinados com as bacterinas comerciais anti-leptospirose A e C, estão dentro dos parâmetros exigidos e essas vacinas foram aprovadas segundo o critério de avaliação internacional (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 1977) que é de 80% de animais sobreviventes na diluição da bacterina recomendada para hamsters. Já as demais vacinas foram reprovadas, não apresentando a proteção esperada para os sorovares com quem foram desafiadas.

As proporções de hamsters vacinados sobreviventes ao desafio com a estirpe L₁-130 do sorovar Copenhageni e caracterizados como portadores renais no 21^o d.p.i. (Tabela 4), mostraram que a proteção conferida pelas duas vacinas aprovadas (A e C), não foi satisfatória, pois apesar, do desafio ter sido efetuado com aproximadamente a metade do menor valor estabelecido pela CFR houve um número elevado de portadores renais de leptospiros entre os sobreviventes. De fato, para o sorovar Copenhageni estirpe L₁-130 a resposta das vacinas não foi satisfatória, mostrando que nenhuma das vacinas testadas protegeu ativamente contra a infecção por esse sorovar. Em termos de proteção contra a doença houve um melhor resultado para as vacinas A e C. No entanto, a vacina A dos oito sobreviventes, cinco apresentaram colonização renal e para a vacina C, dos oito

sobreviventes, três apresentaram colonização renal, e para as outras vacinas, todos os animais sobreviventes tornaram-se portadores renais. Já para o sorovar Canicola estirpe LO₄, utilizando-se a DL50 no limite superior de faixa recomendada (10 a 10.000), os resultados foram satisfatórios, pois as vacinas A e C apresentaram resultados positivos no desafio e também impediram a colonização renal, pois com a vacina A dos dez sobreviventes, nenhum apresentou colonização renal e com a vacina C dos nove sobreviventes, apenas um apresentou colonização renal.

As vacinas A e C foram aprovadas no teste desafio, conferiram proteção quanto a doença clínica, óbito e infecção renal para o sorovar Canicola LO₄, já para o sorovar Copenhageni L₁-130, conferiram proteção quanto a doença clínica e óbito, mas não contra a colonização renal.

Ressalta-se que as duas vacinas aprovadas (A e C) não apresentavam o sorovar Copenhageni em suas formulações, e a possível proteção para o sorovar Copenhageni L₁-130 contra a doença clínica e óbito pode ter sido atribuída a proteção cruzada com o sorovar Icterohaemorrhagiae, presente nas duas formulações. Resultado semelhante foi obtido por Tabata et al., 2002 que encontraram proteção cruzada entre membros do sorogrupo Sejroe. As reações cruzadas entre sorovares de um mesmo sorogrupo ou de sorogrupos diferentes são comuns nas infecções naturais ou nos momentos pós-vacinais (WHO, 1967; GREENE et al., 2006).

No relativo aos resultados obtidos nos desafios efetuados com a estirpe LO₄ do sorovar Canicola, foi possível a constatação de que a despeito das bacterinas A e C serem importadas e produzidas com estirpes de referência deste sorovar, as mesmas conferiram boa proteção contra a doença e infecção produzida por este sorovar, porém com relação as outras sete marcas de vacina testadas, inclusive importadas e nacionais a proteção conferida foi insatisfatória..

No relativo aos resultados de proteção parcial observados nos desafios efetuados com a estirpe L₁-130 do sorovar Copenhageni nos animais imunizados com as bacterinas A e C importadas, produzidas com estirpes de referência do sorovar Icterohaemorrhagiae, deve-se considerar que Cho et al., (1992) constataram que os

lipídios de membrana do sorovar Icterohaemorrhagiae apresentam uma especificidade exclusiva e que o sorovar Copenhageni apresenta alguns componentes antigênicos que estão ausentes no sorovar Icterohaemorrhagiae (ARIMITSU et al., 1980), portanto com base nessas diferenças cães imunizados com vacinas que não contenham o sorovar Copenhageni em sua formulação poderão vir a ser infectados pelo mesmo (RODRIGUES, 2008).

O baixo desempenho das vacinas anti- leptospirose canina comercializadas no Brasil constatado no presente estudo, demonstra que na atualidade no país, a prevenção da leptospirose canina está comprometida, o que pode ter implicações tanto na esfera da saúde animal como da saúde pública veterinária, uma vez que o cão pode ser um importante transmissor da doença tanto para o homem como para outras espécies animais.

7 CONCLUSÕES

Nas condições do presente estudo concluiu-se que:

- a) De nove marcas de vacinas anti-leptospirose canina comercializadas no Brasil submetidas ao teste de potência com desafio em hamsters com estirpes autóctones dos sorovares Canicola e Copenhageni apenas duas foram aprovadas.
- b) A despeito da proteção conferida por duas bacterinas anti-leptospirose canina importadas e produzidas com estirpes de referência do sorovar Icterohaemorrhagiae, ter sido suficiente para proteger os animais contra a doença clínica a mesma não foi capaz de conferir proteção contra a infecção e estabelecimento do estado de portador renal para o sorovar Copenhageni.
- c) A proteção conferida por duas bacterinas anti-leptospirose canina importadas e produzidas com estirpes de referência do sorovar Canicola foi suficiente para proteger os animais contra a doença clínica, infecção e estabelecimento do estado de portador renal no desafio efetuado com estirpe autóctone do sorovar Canicola

REFERÊNCIAS

- ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Leptospirosis. In: ACHA, P. N.; SZYFRE, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 2. ed. Washington: Organizacion Panamericana de La Salud, 1996. cap. 85, p. 626-633.
- ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3. ed. Washington: Organizacion Panamericana de La Salud. 2003. (Publicación Científica, 580).
- ALVES, C. J. **Influência da estimulação inespecífica com BCG sobre a susceptibilidade do hamster à infecção experimental por *L. Interrogans* sorovar Pomona**. 1991. 45 p. Tese (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Univercidade de São Paulo, 1991.
- ARIMITSU, Y.; MORY, M.; AKAMA, K. Cross antigenicities of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni Shibaura strain for preparing biological products in Japan. **Japanese Journal of Medical Science and Biology**, v. 33, n. 4, p. 223-229, 1980.
- AVILA, M. O.; FURTADO, L. R. I.; TEIXEIRA, M.M.; ROSADO, R. L. I.; MARTINS, L. F. S.; BROD, C. S. Aglutininas anti-leptospiricas em cães na área de influencia do centro de controle de zoonoses, Pelotas, RS, Brasil, no ano de 1995. **Ciência Rural**. v.28 n.1, p. 107-110, 1998.
- BADKE, M. R. T. **Leptospirose**. UFSM. Santa Maria – RS, 2001. Disponível em: <www.cnpso.embrapa.br/aboves-sc/pdf/memorias_2001/1_manoelrenatopdf>. Acesso em: 15 abr. 2008.
- BALDWIN, C. J.; ATKINS, C. E. Leptospirosis in the dog. **Compêndio Continuado de Educação e Prática Veterinária**, v. 9, n. 5, p. 499-508, 1987.
- BATISTA, C. S. A.; ALVES, C. J.; AZEVEDO, S. S.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z. M.; CLEMENTINO, 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. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**., v.57, p.179-185, 2005. Suplemento, 2.
- BEY, R. F.; JOHNSON, R. C. Immunogenicity and humoral and cell-mediated immune responses to leptospiral whole cell, outer envelope, and protoplasmic cylinder in hamsters and dogs. **American Journal of Veterinary Research** v. 43, n. 5, p. 835-840, 1982.
- BLAHA, T. **Applied veterinary epidemiology**. Amsterdam: Elsevier, 1989. p.95-103.
- BLAZIUS, R. D.; ROMÃO, P. R. T.; BLAZIUS, E. M. C. G.; DA SILVA, O. S. Ocorrência de cães errantes soropositivos para *Leptospira* spp. na Cidade de Itapema, Santa Catarina. **Caderno Saúde Pública**, v.21, n. 6, 2005.

BLENDEN, D.C. Aspectos epidemiológicos de la leptospirosis Epidemiologia Y control de la leptospirosis, p.160-8. In: **REUNIÓN INTERAMERICANA SOBRE EL CONTROL DE LA FIEBRE AFTOSA Y OTRAS ZONOSSES**, 8., 1976, Washington: OPAS, 1976. p. 160-168. (Publicacion Citifica, 316).

BOLIN, C. A. Diagnosis of leptospirosis: A reemerging disease of companion animals. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)**, v. 11, n. 3, p. 166-171, 1996.

BRANDESPIN, D. F. **Geoprocessamento no estudo de ocorrência de aglutininas para *Leptospira interrogans* sorovares Canicola e Icterohaemorrhagiae na população canina da cidade de Jaboticabal Estado de São Paulo**. 2003. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia Brasileiro de Vigilância Epidemiologica**. 4 ed. rev. Ampl., Brasília, DF: Fundação Nacional da Saude, 1998, Cap. 5. 10 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. Leptospirose. Brasília, MS, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de controle da leptospirose**, Secretaria Nacional de Ações Básicas de Saúde. Divisão Nacional de Zoonoses: MS, 1989.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde Brasil, **Manual de controle de roedores**. Brasília: MS, 2002

BRIHUEGA, B.; HUTTER, E. Incidencia de la leptospirosis en caninos de la ciudad de Buenos Aires. **Veterinaria Argentina**. v.11, n. 102, p. 98-101, 1994.

BROWN, C. A.; ROBERTS, W.; MILLER, M. A.; DAVIS, D. A.; BROWN, S. A.; BOLIN, C. A.; BLACK, J. J.; GREENE, C. E.; LIEBL, D. M. *Leptospira interrogans* serovar grippotyphosa infection in dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 209, n. 7, p. 1265-1267, 1996.

BROWN, K.; PRESCOTT, J. Leptospirosis in the family dog: a public health perspective. *Canadian Medical Association Journal*. v. 178, p.339-401, 2008.

CARVALHO NETO, C. **Estudos sobre a resistência a warfarina em roedores da cidade de São Paulo, SP**. 1986. 74 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Saúde Publica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1986.

CHO, S. N.; UHM, J. R.; KIM, J. D. Comparative analysis of lipopolysaccharide and lipid antigens of leptospira interrogans serovars. **Yonsei Medical Journal**, v. 33, n. 1, p. 24-31, 1992.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Médica Científica, 1992. 843 p.

COSTA, P. D.; GISMONDI, R. C.; SOUZA NETO, B. A. Leptospirose por *Leptospira Australis* – Determinação da cadeia epidemiológica. **Arquivo Brasileiro de Medicina**, Rio de Janeiro, v. 59, n. 5, p. 321-322, 1985.

DZIEZYC, J. Canine systemic bacterial infections. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 30, n. 5, p. 1103-1117, 2000.

ELLIS, W. A.; MCPARLAND, P. J.; BRYSON, D. G.; CASSELS, J. A. Boars as carries of leptospire of the Australis serogroup on farms with sn abortation problem. **The Veterinary Record**, v. 118, n. 20, p. 563, 1986.

ELLIS, W. A. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 10, n. 3, p. 463-478, 1994.

FAINE, S. **Leptospira and leptospirosis**. Boca Raton: CRC, 1994. 353 p.

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

FAVERO, A. C. M. **Emprego de vacinas no controle da leptospirose situação atual e perspectivas**. 1994. ---f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina veterinária) Universidade Paulista – São Paulo – 1994.

FAVERO, A. C. M.; MANGERONA, A. C. S.; ALESSI, L. J.; MORAIS, Z. M.; PINHEIRO, S. R.; FERREIRA NETO, J. S.; VASCONCELLOS, S. A. Aglutininas pós-vacinais em bovinos imunizados com bacterina tetravalente contra a leptospirose Influência de reações pré-vacinais, homólogas e heterólogas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 45-55, 1997.

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

FREITAS, J. C. D.; SILVA, F. G. D.; OLIVEIRA, R. C. D. ; DELBEM, Á. C. B.; MULLER, E. E.; ALVES, L. A.; TELES, P. S. Isolamento de Leptospiras spp de cães,

bovinos e suínos naturalmente infectados. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 34, n. 3, p. 853-856, 2004.

FREUDENSTEIN, H.; HEIN, B. Potency of leptospiral vaccines and protection against chronic infection in golden hamsters. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 14, n. 3, p. 229-234, 1991.

FURTADO, L. R. I.; FEHLBERG, M. F. B.; AVILA, M. O.; TEIXEIRA, M. M.; ROSADO, R. L. I.; MARTINS, L. F. S.; BROD, C. S. Prevalência e avaliação de fatores de risco à leptospirose canina, no município de Pelotas, RS. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo. v. 64, n. 1, p. 57-61, 1997.

GAMBERINI, M.; GOMEZ, R. M.; ATZINGEN, M. V.; MARTINS, E. A.; VASCONCELLOS, S. A.; ROMERO, E.C.; LEITE, L. C.; HO, P. L.; NASCIMENTO, A. L. Whole-genome analysis of leptospira interrogans to identify potential vaccine candidates against leptospirosis. **FEMS Microbiology Letters**, v. 244, n. 2, p. 305-313, 2005

GREENE, C. E.; MILLER, M. A.; BROWN, C. A. Leptospirosis. In: **Infectious diseases of the dog and cat**. 2 ed. Philadelphia. W. B. Saunders, 1998. p. 273-281.

GREENE, C. E.; SCHULTZ, R. D. Immunoprophylaxis. In: GREENE, C. E. (Ed.). **Infectious diseases of the dog and cat**. 3. ed. St. Louis: Elsevier, 2006. p. 1069-1119.

GUIMARÃES, M. C.; CORTES, J.; VASCONCELLOS, S. A.; ITO, F. H. Epidemiologia e controle da leptospirose bovina. Importância do portador renal e do seu controle terapêutico. **Comunicações Científicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 6/7, n.1/4, p. 21-34, 1982/1983.

HAGIWARA, M. K. Boletim Técnico Pfizer Saúde Animal, **Leptospirose canina**. p. 1-6, 2003.

HARKIN, K. R.; GARTRELL, C. L. Canine Leptospirosis in New Jersey and Michigan: 17 cases (1990-1995). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 32, p. 495-501, 1996

HARKIN, K. R.; ROSHTO, Y. M.; SULLIVAN, J. T. Clinical application of a polymerase chain reaction assay for diagnosis of leptospirosis in dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 222, n. 9, p. 1224-1229, 2003.

HOMEM, V. S. F.; HEINEMANN, M. B.; MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A. ; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S. Estudo epidemiológico da Leptospirose bovina e humana na Amazônia oriental brasileira. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 2, p. 173-180, 2001.

IDO, Y.; HOKI, R.; ITO, H.; WANI, H. The rat as carrier of *Spirochaeta icterohaemorrhagiae*, the causative agente of Weil's diseases. **Journal of Experimental Medicine**. v. 26, p. 341, 1917.

INADA, R.; IDO, Y.; HOKI, R.; KANEKA, R.; ITO, H. The etiology mode of infection, and specifec therapy of Weil's disease (*Spirochaetosis icterohaemorrhagica*). **Journal of Experimental Medicine**, v. 23, p. 377, 1916.

JOUGLARD, S. D. D. **Prevalência da leptospirose canina, fatores de risco e constituição da população no meio rural do Município de Pelotas, RS**. 1999. 73 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas – RS, 1999.

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

KO, A. I.; REIS, M. G.; DOURADO, C. M. R.; JOHNSON JR., W.; RILEY, L. W. Urban Epidemic of severe leptospirosis em Brasil. **Lancet**, v. 354, p. 880-825, 1999.

KOBAYASHI, Y.; TAMAI, T.; OYAMA, T.; HASEGAWA, H.; SADA, E.; KUSABA, T.; HAMAJI, M. Characterization of monoclonal antibodies against etiological agents of Weil's disease. **Microbiology and Immunology**, v. 28, n. 3, p. 359-370, 1984.

KOBAYASHI, Y.; TAMAI, T.; SADA, E. Serological analysis of serogroup icterohaemorrhagiae using monoclonal antibodies. **Microbiology and Immunology**, v. 29, n. 12, p. 1229-1235, 1985.

_____. Antigenic analysis of serogroup Icterohaemorrhagiae using monoclonal antibodies. **Israel Journal of Medical Science and Biology**, v. 43, n. 4, p. 737-738, 1987.

KOGIKA, M. M.; HAGIWARA, M. K.; BACCARO, M. R. Metastatic calcification in a dog with leptospirosis. **Canine Practice**, v. 17, n. 4, p. 35-38, 1992.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Veterinary**, v. 14, p. 296-326, 2001.

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 soroaglutinação microscópica. **Ars Veterinária**, v. 18, n. 1, p. 54-61, 2002.

LARSSON, C. E. Leptospirose: Interpretação das reações sorológicas utilizadas no diagnóstico. **Revista Cães e Gatos**, v. 5, p.10-13, São Paulo, 1989

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

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. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 58, n. 2, p.167-174, 2006.

MASCOLLI, R.; PINHEIRO, S. R.; VASCONCELOS, A. S.; FERREIRA, F.; MORAIS, Z. M.; PINTO, C. O.; SUCUPIRA, M. C. A.; DIAS, R. A.; MIRAGLIA, F.; CORTEZ, A.; SILVEIRA DA COSTA, S.; TAVATA, R.; MARCONDES, A. G. Inquérito sorológico para leptospirose em cães do Município de Santana de Parnaíba, São Paulo, utilizando a campanha de vacinação anti-rábica do ano de 1999. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, p. 25-32, 2002.

MIYAJIMA, M. “**Demonstração do Spirochaeta da moléstia de Weil e da febre da mordedura do rato**”. Sessão ordinária de 01/03/1919 da Sociedade Médica de Cirurgia de São Paulo, v. 2, p. 5-9, 1919/1920.

MCDONOUGH, P. L. Leptospirosis in dogs – Current status. In: CARMICHAEL, L. **Recent advances in canine infectious diseases**. Ithaca: International Veterinary Information Service, 2001. Disponível em: www.ivis.org. acesso em: 15 abr. 2008.

MURHEKAR, M. V.; SUGUNAN, A. P.; VIJAYACHARI, P.; SHARMA, S.; SEHGAL, S. C. Risk factors in the transmission of leptospiral infection. **Indian Journal Medicine Research**. v. 107, p. 218-223, 1998.

MYERS, D. **Manual de métodos para El diagnostico de laboratorio de La leptospira**. Martinez: OPAS, Centro Panamericano de Zoonosis, 1985.

NASCIMENTO, A. L.; KO, A. I.; MARTINS, E. A.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; HO, P. L.; HAAKE, D. A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; HARTSKEERL, R. A.; MARQUES, M. V.; OLIVEIRA, M. C.; MENCK, C. F. M.; LEITE, C. C.; CARRER, H.; COUTINHO, L. L.; DEGRAVE, W. M.; DELLAGOSTIN, O. A.; EL-DORRY, H.; FERRO, E. S.; TERRO, M. I. T.; FURLAN, L. R.; GAMBERINI, M.; GIGLIOT, E. A.; GÓES-NETO, A.; GOLDMAN, G. H.; GOLDMAN, M. H. S.; HARAKAVA, R.; JERÔNIMO, S. M. B.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; KIMURA, E. T.;

KURAMAE, E. E.; LEMOS, E. G. M.; LEMOS, M. V. F.; MARINO, C. L.; NUNES, L. R.; OLIVEIRA, R. C.; PEREIRA, G. G.; REIS, M. S.; SCHRIEFER, A.; SIQUEIRA, W. J.; SOMMER, P.; TSAI, S. M.; SIMPSON, A. J. G.; FERRO, J. A.; CAMARGO, L. E. A.; KITAJIMA, J. P.; SETUBAL, J. C.; VAN SLUYS, M. A. Comparative Genomics of Two *Leptospira interrogans* Serovars Reveals Novel Insights into Physiology and Pathogenesis. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 7, p. 2164-2172, 2004.

NIELSEN, J. N.; COCHRAN, G. K.; CASSELS, J. A.; HANSON, L. E. *Leptospira interrogans* serovar *Bratislava* infection in two dogs. **Journal of American Veterinary Medical Associations**, v. 199, n. 3, p. 351-352, 1991

NOGUCHI, H. The survival of leptospira (*Spirochaeta icterohaemorrhagiae*) in nature observations, concerning microchemical reactions and intermediary hosts. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 27, p. 609-625, 1918.

9 CFR. Code of Federal Regulations. Animals and animal products. In: _____. **Animal and plant health inspection service, department of agriculture**. *Leptospira Canicola bacterin*. Washington, DC: Government Printing Office, 2006. Chap. 1, pt 113. p. 12-23. (SAM 609 - 9 CFR 113.103).

OIE. ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ ANIMALE, disponível em: <www.oie.int> acesso em 07 abr. 2008.

OLIVEIRA, P. M. A. **Animais silvestres e exóticos na clínica particular**. 1 ed., São Paulo: Roca, 2003.

PENA-MOCTEZUMA, A.; BULACH, D. M.; KALAMBAHETI, T.; ADLER, B. Comparative Analysis of the LPS Biosynthetic Loci of the Genetic Subtypes of Serovar Hardjo: *Leptospira interrogans* Subtype Hardjoprajitno and *Leptospira borgpetersenii* Subtype Hardjobovis. **Fems Microbiology Letters**, v. 177, p. 319-326, 1999.

PEREIRA, M. M.; PEREIRA DA SILVA, J. J.; BAUAB, A. R.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAES, Z.M.; BARANTON, G.; SAINT GIROUS, J. A. Clonal subpopulation of *Leptospira interrogans sensu stricto* is the major cause of leptospirosis outbreaks in Brazil. **Journal of Clinical Microbiol.** v. 38, p. 450-452, 2000.

PERRY, G.; HEARD, R.; RYAN, G.; OLIVER, G.; ROBINSON, B.; MARTIN, R. A. **Scientific review of leptospirosis and implications for quarantine policy-precis**. Australian: Australian Quarantine and Inspection Service, Australia, 2000. 91 p.

PERROCHEAU, A.; PEROLAT, P. Epidemiology of leptospirosis in New Caledonia (South Pacific): a one-year survey. **European Journal of Epidemiology**, Rome, v. 13, n. 2, p. 161-167, 1997.

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

PRESCOTT, J. F.; FERRIER, R. L.; NICHOLSON, V. M.; JOHNSTON, K. M.; HOFF, B. Is canine leptospirosis underdiagnosed in southern Ontario? A case report and serological survey. **Canadian Veterinary Journal**, v. 32, p. 481-486, 1991.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **American Journal of Epidemiology**, v. 27, n. 3, p. 493-497, 1938.

RENTKO, V. T.; CLARK, N.; ROSS, L. A.; SCHELLING, S. H. Canine leptospirosis – A retrospective study of 17 cases. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 6, n. 4, p. 235-244, 1992.

RODRIGUES, A. M. A. **Leptospirose Canina: diagnóstico etiológico, sorológico e molecular e avaliação da proteção cruzada entre os sorovares Icterohaemorrhagiae e Copenhageni.** 2008. 116 f. – Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

ROMERO, E. C.; BERNARDO, C. C.; YASUDA, P. H. Human leptospirosis: a twenty-nine-year serological study in Sao Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo**, v. 45, p. 245-248, 2003

RUBEL, D.; SEIJO, A.; CERNIGOI, B.; VIALE, A.; COLLI, C. W. Leptospira interrogans em uma población canina Del Gran Buenos Aires: variable asociadas com La soropositividad. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 2, n. 2, p. 102-105, 1997.

SANTA ROSA, C. A. Diagnóstico laboratorial da leptospirose. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.1, n. 2, p. 97-109, 1970.

SAKATA, E. E.; YASUDA, P. H.; ROMERO, E. C.; SILVA, M. V.; LOMAR, A. V. Sorovares de Leptospira interrogans isolados de casos de leptospirose humana em São Paulo. Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**. São Paulo, v. 34, p. 217-221, 1992.

SINDAN. Sindicato Nacional da Industria de Produtos para a Saúde Animal. **Manual de Produtos Veterinários**. 1. ed. São Paulo: SINDAN, 1997.

SILVA, H. R.; TAVARES-NETO, J.; BINA, J. C.; MEYER, R. Leptopirose-infecção e forma subclínica em crianças de Salvador, Bahia. **Revista da Sociedade Brasileira Medicina Tropical**. v. 36, p. 227-233, 2003.

SMITH, C. R.; KETTERER, P. J.; CORNEY, B. G. A review of laboratory techniques and their use in the diagnosis of leptospira interrogans serovar *Hardjo* infection in cattle. **Australian Veterinary Journal**, v. 71, n. 9, p. ----,1994.

TABATA, R.; SCANAVINI NETO, H.; ZUANAZE, M. A. F.; OLIVEIRA, E. M. A.; DIAS, 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 sejroe. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 267-270, 2002

TESSEROLLI, G. L., ALBERTI, J. V. A., BERGAMASCHI, C., FAYZANO, L.; AGOTTANI, J. V. B. Principais sorovares de leptopirose canina em Curitiba, Paraná. **PUBVET**, v. 2, n. 21, Art. 239, p.----, 2008.

THIERMANN, A. B. Isolation of leptospire in diagnosis of Leptospirosis. **Modern Veterinary Practice**, v. 5, n. 10, p. 758-759, 1984.

THIERMANN, A. B. Leptospirosis: current developments and trends. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 184, n. 6, p. 722-725, 1984.

TURNER, L. H. Special Article. Leptospirosis I. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, n. 6, p. 842-855, 1967.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE ANIMAL PLANT HEALTH INSPECTION SERVICE VETERINARY SERVICES LABORATORIES **Supplemental assay method for potency assay of Leptospira interrogans serotype Pomona bacterins**. Ames: 1977. [11p]. (SAM 608-9CFR113.86)

VASCONCELLOS, S. A. O papel dos reservatórios na manutenção da leptopirose na natureza. **Comunicações científicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo**, v. 11, n. 1, p. 17-24, 1987.

VASCONCELLOS, L. M.; CISALPINO, E. O.; VIEIRA, M. N. R.; KOURY, M. C. Pesquisa de aglutininas antileptospira em diferentes grupos profissionais na cidade de Londrina, Paraná. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 25 n. 4, p. 251-255, 1992

VASCONCELLOS, S.A. Leptopirose em animais domésticos e silvestre Prevenção e controle In: **Anais do evento comemorativo do centenário do Instituto Oswaldo Cruz e da Fundação Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 2000. p. 181-208.

WARD, M. P. Seasonality of canine leptospirosis in the United States and Canada and its association with rainfall. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 56, p. 203-213, 2002.

WARD, M. P.; GLICKMAN, L. T.; GUPTILL, L. F. Prevalence of and risk factors for leptospirosis among dogs in the United States and Canada: 677 cases (1970-1998). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 220, n. 1, p. 53-58, 2002b.

WOHL, J. S. Canine Leptospirosis. **Compendium in Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 18, n. 11, p. 1215-1225, 1996.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Current problems in leptospirosis research: Report of a WHO expert group**. Geneva: World Health Organization, 1967. (Technical Report Series of the World Health Organization n° 380).

YASUDA, P. H. **Leptospirose em cães errantes da cidade de São Paulo**. 1979. 92 p. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1979

YASUDA, P. H.; SANTA ROSA, C.A.; YANAGUITA, R.M. *Variação sazonal na prevalência de leptospirose em cães de rua da cidade de São Paulo, Brasil*. **Revista Saúde pública, S. Paulo**, v. 14, p. 589-596, 1980.