

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

CINÉTICA DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL EM CÃES IMUNIZADOS COM  
*Leptospira interrogans* SOROVARES *icterohaemorrhagiae*, *canicola*, *pomona*  
E *grippotyphosa*

CURITIBA

2005

**DEISE CRISTIANE FERRONATO DE SOUZA JASZCZERSKI**

**CINÉTICA DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL EM CÃES IMUNIZADOS COM  
*Leptospira interrogans* SOROVARES *icterohaemorrhagiae*, *canicola*, *pomona*  
E *grippotyphosa***

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração: Patologia, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

Orientador:  
Prof. Dr. José Francisco Ghignatti Warth

**CURITIBA**

**2005**

**AOS MEUS PAIS**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu marido MARCO AURÉLIO e aos meus filhos EMANUELLE e MARCUS VINÍCIUS que conseguiram driblar o tempo e a organização do lar sem a presença da mamãe.

Aos professores FOGAÇA e ROMILDO que confiaram em mim.

Ao professor ALEX que conhece os obstáculos da pesquisa científica e que nobremente cedeu os cães para este experimento.

Ao MARCOS VINÍCIUS que abriu mão do seu sábado e do seu conhecimento em gráficos para enriquecer este trabalho.

À minha irmã DANIELLE que me ajudou com os cães e no transporte de documentos e filhos.

Ao meu sogro JOÃO CARLOS que me deu orientações.

Às médicas veterinárias NANCY e KARINE e à estagiária MARIAN que não mediram esforços para assistir tão bem os cães.

Às bibliotecárias SIMONE e VERA que se esforçam, e muito, contribuindo com as informações necessárias para que este e muitos outros trabalhos científicos possam ser concluídos.

À médica veterinária MARIA LUÍZA, do Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti-SEAB-PR, que contribuiu com a bibliografia.

À MARIA JOSÉ, da Pós-Graduação do Departamento de Medicina Veterinária que me atendeu prestativamente em relação aos prazos e documentações exigidos.

Aos meus chefes TCel MELO e Maj STONOGA que me permitiram o tempo-livre.

E principalmente a ELE:

Que me encheu de “gás”, quando eu só pedi mais um pouquinho de força;

Que só pôs gente amiga no meu caminho;

Que me deu a luz necessária para enxergar além;

Que me permitiu chegar ao fim;

Que é a minha razão para continuar.

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

Ao meu orientador, Prof. Dr. JOSÉ FRANCISCO, por ter me aceito; pelo constante otimismo e bom-humor; por ser tão incansável; por não medir esforços; por envolver a própria família, abrindo mão do tempo e da privacidade; por nunca ter dito não; pela vontade de descobrir e questionar; pelo envolvimento e disposição; pela honestidade; e finalmente, por sempre dizer: “Fica tranqüila, vai dar tudo certo!”

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	vi
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	vii
<b>RESUMO</b> .....	xi
<b>ABSTRACT</b> .....	xii
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	4
2.1 HISTÓRICO DA LEPTOSPIROSE .....	4
2.2 ETIOLOGIA E CLASSIFICAÇÃO .....	5
2.2.1 As Espiroquetas .....	5
2.2.2 <i>Leptospira interrogans</i> .....	5
2.3 EPIDEMIOLOGIA .....	7
2.4 PATOGÊNESE .....	11
2.5 SINAIS CLÍNICOS .....	15
2.6 DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO DA LEPTOSPIROSE .....	17
2.7 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL .....	23
2.8 VACINAS .....	23
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	28
3.1 ANIMAIS DO EXPERIMENTO .....	28
3.2 IMUNÓGENO UTILIZADO .....	28
3.3 VACINAÇÕES .....	28
3.4 COLHEITA DE SANGUE E OBTENÇÃO DE SOROS .....	29
3.5 BASE FÍSICA LABORATORIAL .....	29
3.6 TÉCNICA SOROLÓGICA EMPREGADA .....	29
<b>4 RESULTADOS</b> .....	31
4.1 TÍTULOS PRÉ-VACINAIS .....	31
4.2 TÍTULOS PÓS-VACINAIS AOS 30 DIAS .....	33
4.3 TÍTULOS PÓS-VACINAIS AOS 60 DIAS .....	36
4.4 TÍTULOS PÓS-VACINAIS AOS 90 DIAS .....	39
4.5 TÍTULOS PÓS-VACINAIS AOS 120 DIAS .....	42
4.6 TÍTULOS PÓS-VACINAIS AOS 150 DIAS .....	45
4.7 TÍTULOS PÓS-VACINAIS AOS 180 DIAS .....	47

4.8 TÍTULOS PÓS-VACINAIS AOS 210 DIAS.....	50
5 <b>DISCUSSÃO</b> .....	56
6 <b>CONCLUSÕES</b> .....	64
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	65
<b>ANEXOS</b> .....	71

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 –TÍTULOS SOROLÓGICOS, PRÉ-VACINAIS PARA *L. interrogans*, SOROVARES *icterohaemorrhagiae*, *canicola*, *copenhageni*, *pomona* e *grippotyphosa*, DOS 16 CÃES, NO DIA CONSIDERADO 0 (zero) ...31
- TABELA 2 - TÍTULOS SOROLÓGICOS AOS 30 DIAS PÓS-VACINAIS PARA *L. interrogans*, SOROVARES *icterohaemorrhagiae*, *canicola*, *copenhageni*, *pomona* e *grippotyphosa*, DOS 16 CÃES EXPERIMENTAIS.....33
- TABELA 3 –TÍTULOS SOROLÓGICOS AOS 60 DIAS PÓS-VACINAIS PARA *L. interrogans*, SOROVARES *icterohaemorrhagiae*, *canicola*, *copenhageni*, *pomona* e *grippotyphosa*, DOS 16 CÃES EXPERIMENTAIS.....37
- TABELA 4 –TÍTULOS SOROLÓGICOS AOS 90 DIAS PÓS-VACINAIS PARA *L. interrogans*, SOROVARES *icterohaemorrhagiae*, *canicola*, *copenhageni*, *pomona* e *grippotyphosa*, DOS 16 CÃES EXPERIMENTAIS.....40
- TABELA 5 –TÍTULOS SOROLÓGICOS AOS 120 DIAS PÓS-VACINAIS PARA *L. interrogans*, SOROVARES *icterohaemorrhagiae*, *canicola*, *copenhageni*, *pomona* e *grippotyphosa*, DOS 16 CÃES EXPERIMENTAIS.....43
- TABELA 6 –TÍTULOS SOROLÓGICOS AOS 150 DIAS PÓS-VACINAIS PARA *L. interrogans*, SOROVARES *icterohaemorrhagiae*, *canicola*, *copenhageni*, *pomona* e *grippotyphosa*, DOS 16 CÃES EXPERIMENTAIS.....45
- TABELA 7 –TÍTULOS SOROLÓGICOS AOS 180 DIAS PÓS-VACINAIS PARA *L. interrogans*, SOROVARES *icterohaemorrhagiae*, *canicola*, *copenhageni*, *pomona* e *grippotyphosa*, DOS 16 CÃES EXPERIMENTAIS.....48
- TABELA 8 –TÍTULOS SOROLÓGICOS AOS 210 DIAS PÓS-VACINAIS PARA *L. interrogans*, SOROVARES *icterohaemorrhagiae*, *canicola*, *copenhageni*, *pomona* e *grippotyphosa*, DOS 16 CÃES EXPERIMENTAIS.....50

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PRÉ-VACINAIS PARA <i>Leptospira interrogans</i> SOROVAR <i>copenhageni</i> .....	32
FIGURA 2 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PRÉ-VACINAIS PARA <i>Leptospira interrogans</i> SOROVARES <i>icterohaemorrhagiae</i> , <i>canicola</i> , <i>pomona</i> E <i>grippotyphosa</i> .....	32
FIGURA 3 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PÓS-VACINAIS PARA <i>Leptospira interrogans</i> SOROVAR <i>copenhageni</i> aos 30 DIAS.....	34
FIGURA 4 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PÓS-VACINAIS PARA <i>Leptospira interrogans</i> SOROVAR <i>canicola</i> AOS 30 DIAS .....	34
FIGURA 5 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PÓS-VACINAIS PARA <i>Leptospira interrogans</i> SOROVAR <i>grippotyphosa</i> AOS 30 DIAS .....	35
FIGURA 6 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PÓS-VACINAIS PARA <i>Leptospira interrogans</i> SOROVAR <i>pomona</i> AOS 30 DIAS .....	35
FIGURA 7 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PRÉ E PÓS-VACINAIS PARA <i>Leptospira interrogans</i> SOROVAR <i>icterohaemorrhagiae</i> DURANTE OS 210 DIAS DE EXPERIMENTO.....	36
FIGURA 8 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PÓS-VACINAIS PARA <i>Leptospira interrogans</i> SOROVAR <i>copenhageni</i> AOS 60 DIAS.....	37
FIGURA 9 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PÓS-VACINAIS PARA <i>Leptospira interrogans</i> SOROVAR <i>canicola</i> AOS 60 DIAS .....	38
FIGURA 10 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PÓS-VACINAIS PARA <i>Leptospira interrogans</i> sorovar <i>grippotyphosa</i> aos 60, 90, 120, 150, 180 E 210 DIAS.....	38
FIGURA 11 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PÓS-VACINAIS PARA <i>Leptospira interrogans</i> SOROVAR <i>pomona</i> AOS 60 DIAS .....	39
FIGURA 12 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PÓS-VACINAIS PARA <i>Leptospira interrogans</i> SOROVAR <i>copenhageni</i> AOS 90 DIAS.....	40
FIGURA 13 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PÓS-VACINAIS PARA <i>Leptospira interrogans</i> SOROVAR <i>canicola</i> AOS 90 DIAS .....	41
FIGURA 14 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PÓS-VACINAIS PARA <i>Leptospira interrogans</i> SOROVAR <i>pomona</i> AOS 90 DIAS .....	41

FIGURA 15 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PÓS-VACINAIS PARA <i>Leptospira interrogans</i> SOROVAR <i>copenhageni</i> AOS 120 DIAS.....	43
FIGURA 16 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PÓS-VACINAIS PARA <i>Leptospira interrogans</i> SOROVAR <i>canicola</i> AOS 120 DIAS .....	44
FIGURA 17 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PÓS-VACINAIS PARA <i>Leptospira interrogans</i> SOROVAR <i>pomona</i> AOS 120 DIAS.....	44
FIGURA 18 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PÓS-VACINAIS PARA <i>Leptospira interrogans</i> SOROVAR <i>copenhageni</i> AOS 150 DIAS.....	46
FIGURA 19 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PÓS-VACINAIS PARA <i>Leptospira interrogans</i> SOROVAR <i>canicola</i> AOS 150 DIAS .....	46
FIGURA 20 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PÓS-VACINAIS PARA <i>Leptospira interrogans</i> SOROVAR <i>pomona</i> AOS 150 DIAS.....	47
FIGURA 21 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PÓS-VACINAIS PARA <i>Leptospira interrogans</i> SOROVAR <i>copenhageni</i> AOS 180 DIAS.....	48
FIGURA 22 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PÓS-VACINAIS PARA <i>Leptospira interrogans</i> SOROVAR <i>canicola</i> AOS 180 DIAS .....	49
FIGURA 23 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PÓS-VACINAIS PARA <i>Leptospira interrogans</i> SOROVAR <i>pomona</i> AOS 180 DIAS.....	49
FIGURA 24 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PÓS-VACINAIS PARA <i>Leptospira interrogans</i> SOROVAR <i>copenhageni</i> AOS 210 DIAS.....	51
FIGURA 25 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PÓS-VACINAIS PARA <i>Leptospira interrogans</i> SOROVAR <i>canicola</i> AOS 210 DIAS .....	51
FIGURA 26 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PÓS-VACINAIS PARA <i>Leptospira interrogans</i> SOROVAR <i>pomona</i> AOS 210 DIAS.....	52
FIGURA 27 - GRÁFICO COMPARATIVO ENTRE OS TÍTULOS AGLUTINANTES DOS TRÊS PRINCIPAIS SOROVARES DURANTE OS 210 DIAS DE EXPERIMENTO – ANIMAL 01.....	53
FIGURA 28 - GRÁFICO COMPARATIVO ENTRE OS TÍTULOS AGLUTINANTES DOS TRÊS PRINCIPAIS SOROVARES DURANTE OS 210 DIAS DE EXPERIMENTO – ANIMAL 03.....	53
FIGURA 29 - GRÁFICO COMPARATIVO ENTRE OS TÍTULOS AGLUTINANTES DOS TRÊS PRINCIPAIS SOROVARES DURANTE OS 210 DIAS DE EXPERIMENTO – ANIMAL 05.....	54

FIGURA 30 - GRÁFICO COMPARATIVO ENTRE OS TÍTULOS AGLUTINANTES DOS TRÊS PRINCIPAIS SOROVARES DURANTE OS 210 DIAS DE EXPERIMENTO – ANIMAL 07.....	54
FIGURA 31 - GRÁFICO COMPARATIVO ENTRE OS TÍTULOS AGLUTINANTES DOS TRÊS PRINCIPAIS SOROVARES DURANTE OS 210 DIAS DE EXPERIMENTO – ANIMAL 09.....	55
FIGURA 32 - GRÁFICO COMPARATIVO ENTRE OS TÍTULOS AGLUTINANTES DOS TRÊS PRINCIPAIS SOROVARES DURANTE OS 210 DIAS DE EXPERIMENTO – ANIMAL 11.....	55

## LISTA DAS ABREVIATURAS

ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Fosfatase Alcalina
BUN	Nitrogênio Sangüíneo Proveniente da Uréia
C	Células Completas
CP	Cilindros Protoplasmáticos
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio Imunoenzimatico (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
IFD	Prova de Imunofluorescência Direta
Ig	Imunoglobulinas Tipo A, G e M (IgA, IgGe IgM)
IOC	Instituto Osvaldo Cruz
LDH	Desidrogenase Láctica
M	Mol
MAT	Teste Microscópico de Aglutinação
ME	Membrana Externa
NaCl	Cloreto de Sódio
OMC	Outer Membrane Complex
PCR	Reação em Cadeia Polimerase
RPM	Rotações Por Minuto
SAM	Teste de Soroaglutinação Microscópica
UFPR	Universidade Federal do Paraná
WHO	World Health Organization

## RESUMO

Com o objetivo de verificar as respostas imunes humorais para *Leptospira interrogans*, 16 cães da raça Beagle foram vacinados com bacterina inativada comercial contendo como antígenos os sorovares *icterohaemorrhagiae*, *canicola*, *pomona* e *grippotyphosa*. As imunizações, em número de duas, foram realizadas no dia considerado zero e no 90º dia. As sete colheitas de amostras sangüíneas foram efetuadas a partir do dia da primo-vacinação com intervalos de 30 dias entre elas, sendo submetidas a técnica de Soroaglutinação Microscópica sob microscopia de Campo Escuro. Verificou-se aos 30 dias pós-vacinais, um aumento, do tipo *booster*, nos títulos direcionados para o sorovar *copenhageni*, quando comparados com os pré-vacinais, demonstrando a íntima relação antigênica deste, com o sorovar *icterohaemorrhagiae*, já relatada anteriormente. Os títulos aglutinantes pós-vacinais direcionados para os demais sorovares, mantiveram-se entre 1/25 e 1/100, não sendo detectados nesta última titulação, após o 90º dia. Neste estudo demonstrou-se, diante da literatura pesquisada, a carência de parâmetros científicos que avaliem a eficiência vacinal das bacterinas anti-leptospira, assim como, informações a respeito da titulação ideal que seja protetora frente a infecções naturais. A presente pesquisa alerta para os riscos à infecção a que estão submetidos os cães, mesmo vacinados, devido a efemeridade dos títulos pós-vacinais alcançados, devendo ser efetuadas imunizações com intervalos mais curtos entre elas, com o emprego de vacinas direcionadas unicamente para sorovares de *Leptospira* e não incluídas em vacinas anti-virais polivalentes, como as atualmente utilizadas .

**PALAVRAS-CHAVE:** vacinação, cães, bacterinas, microaglutinação, *Leptospira*

## ABSTRACT

Sixteen beagles dogs had been vaccinated against *Leptospira* (commercial bacterin with *icterohaemorrhagiae*, *canicola*, *pomona* and *grippotyphosa* serovars) the objective was verify the humoral immune response of these animals. Two vaccinations had been carried, one in the 0 day and another after 90 days. Seven blood samples had been collected after the first vaccination with a period of thirty days between them. All samples were submitted to serological microscopic agglutination test in dark camp. After 30 days to vaccination it verified an increase (booster type) in titers to *copenhageni* serovar. It demonstrates the close antigenic relation between this serovar with the serovar *icterohaemorrhagiae*, according to literature description. The titers after vaccination to another serovars maintain between 1/25 e 1/100 and do not be detected in the last samples collected. In this study it was demonstrated the absence of scientific parameters to evaluate the vaccinal efficiency of bacterins against leptospirosis and informations about the titers to be effective in a natural infection. This research shows infection risks that the dogs are submitted, when they are vaccinated, because had the short duration of the after vaccination titers. Thus, it is suggested to reduce the time between the vaccinations and use vaccine with *Leptospira* serovars do not together in multi antiviral vaccines.

Key words: vaccination, dogs, bacterin, microscopic agglutination, *Leptospira*

## 1 INTRODUÇÃO

A Leptospirose é uma enfermidade cosmopolita grave que acomete diferentes espécies de animais domésticos, silvestres e o homem. Sua ocorrência pode levar a elevados prejuízos econômicos na indústria pecuária e refletir significativamente na saúde pública (RUSSELL; RUSSELL, 1994; LANGONI *et al.*, 2002).

Dados da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2003) não precisam o número exato de casos no mundo, mas a sua prevalência é estimada em 0.1-1 caso para cada 100.000 pessoas ao ano nas demais regiões do globo, aumentando para 10-100 casos para cada 100.000 pessoas ao ano nas regiões de clima tropical úmido.

No Brasil, esta zoonose é endêmica. De acordo com a Fundação Nacional de Saúde do Brasil (FUNASA, 2001), é considerada como uma doença sob influência sócio-econômica, por possuir relações estreitas com a falta de saneamento que ocorre em proporções aceleradas nas áreas urbanas e rurais, como o crescimento descontrolado de favelas e a carência de uma política educacional e de infra-estrutura.

Somente as melhorias nas condições de habitação e saneamento, suprimindo a deficiência de urbanização e drenagem, paralelamente com investimento em educação e saúde, poderão minimizar a sua incidência em populações humanas (LANGONI *et al.*, 2002). Seu controle dependerá obrigatoriamente das ações envolvendo o governo, os laboratórios e indústrias farmacêuticas e o comprometimento social.

Segundo dados do Centro de Informação em Saúde para Viajantes (CIVES, 2005), entre 1985 e 1997, foram notificados no Brasil 35.403 casos de leptospirose, com 3.821 óbitos (letalidade média de 12,5%). Apenas os casos mais graves (ictéricos) são, geralmente, diagnosticados e, eventualmente notificados, o que representa apenas uma pequena parcela (provavelmente cerca de 10%) do número real de casos no Brasil (FUNASA, 2001) (ANEXO 10).

A Secretaria de Saúde do Paraná reúne dados que apresentam uma taxa de letalidade que atinge 17% verificando-se um aumento progressivo desde 1997 (SESA, 2004).

Segundo MASUDA *et al.* (2003), o número de casos entre cães vem aumentando gradativamente, particularmente na região metropolitana de Curitiba-Pr, onde observaram também alteração na dinâmica da ocorrência dos sorovares mais freqüentes, o que concluíram ser uma conseqüência do crescimento populacional, bem como, do resultado de uma seleção vacinal. Através de inquérito sorológico levantaram que 30,27% da população canina teve contato prévio com o agente infeccioso.

A epidemiologia e a incidência desta zoonose urbana é favorecida pelas condições reinantes nas grandes cidades onde são encontradas grandes populações caninas e de roedores, bem como, bolsões periurbanos de pobreza, favorecendo a disseminação e a manutenção do agente infeccioso de maneira permanente.

O rato de esgoto (*Rattus norvegicus*) é o principal responsável pela infecção humana, em razão de coexistir, em grande número, na proximidade de seres humanos. A *Leptospira interrogans* multiplica-se nos rins destes animais sem causar danos, sendo eliminada pela urina, às vezes por toda a vida do animal, o que torna estes roedores o seu principal propagador. O homem é infectado casual e transitoriamente, não tendo importância como transmissor da doença de uma pessoa para outra (VASCONCELLOS *et al.*, 1997; CIVES, 2005).

O controle da leptospirose urbana só poderá ter sucesso através de um programa de saúde pública adequado que vise práticas de higiene, eliminação de roedores e isolamento de animais infectados, com conseqüente tratamento quimioterápico, aliado ao uso de vacinas na população canina como medida profilática (RUSSELL, RUSSELL, 1994).

A vacinação contra a leptospirose em animais é uma prática comum e um método eficaz de controle, geralmente adotado por proprietários que possuem condições econômicas razoáveis. Muitas vacinas estão disponíveis comercialmente, mas existem evidências conflitantes em se tratando da eficácia das mesmas (BLOOD, RADOSTITS, 2002). Pesquisas sobre o tempo de manutenção desta imunidade pós-vacinal, que realmente seja capaz de neutralizar uma possível infecção, não são encontradas na literatura científica especializada.

A grande quantidade de vacinas sendo oferecida no mercado, a tendência ao uso de vacinas polivalentes, a distribuição sazonal da doença em um país

continental como o Brasil, a diversidade e a dinâmica dos sorovares levam a necessidade de atualizações constantes no que se refere aos aspectos imunoproliféricos desta doença, justificando o presente estudo.

Com o objetivo de verificar a resposta sorológica pós-vacinal e o tempo de manutenção da mesma, idealizou-se a presente pesquisa.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 HISTÓRICO DA LEPTOSPIROSE

Esta síndrome icterica com falência renal foi descrita pela primeira vez em 1880, no Cairo, por Larrey, provavelmente introduzida na Europa pelo *Rattus norvegicus* proveniente da Ásia no século XVIII. Os estudos deram seqüência através dos trabalhos de Landouzy, em 1883, mas foi Weil, porém, que em 1886, descreveu-a minuciosamente, observando quatro casos clínicos em seres humanos. Posteriormente, a leptospirose foi designada, por Goldschmidt, como “Doença de Weil”. A etiologia bacteriana foi estudada concomitantemente, em meados do ano de 1915, por Inada e Ido, no Japão, e por Uhlenhuth e Frommer, na Alemanha. Estes últimos detectaram as espiroquetas na corrente sangüínea de porcos inoculados com sangue de soldados infectados pela “Doença Francesa”. Porém, foram os estudos de Inada que deram origem as primeiras publicações de trabalhos sobre leptospirose (LEVETT, 2001; WHO, 2003).

No Brasil, de acordo com RIQUELME (1985), o interesse pela leptospirose canina, começou com os estudos de Dacorso Filho, em 1940. Desde então, inúmeras pesquisas foram realizadas por diversos autores, entre eles Hagiwara e Santa Rosa (1975), que detectaram anticorpos contra 18 sorotipos de leptospiras em 7,5% de cães investigados na cidade de São Paulo. De acordo com este mesmo trabalho, Guida (1949) encontrou, também em São Paulo, 31% de casos; Veronesi *et al.* (1956) 9,6% e Santa Rosa (1970) 13,8%. Dando seqüência ao levantamento epidemiológico, Caldas e Sampaio (1977) investigaram 888 casos em Salvador (BA), que resultaram em 15% de casos positivos para leptospirose. Yasuda *et al.* (1980), em São Paulo, analisaram 1428 soros da espécie canina, detectando 21,6% de soropositivos.

## 2.2 ETIOLOGIA E CLASSIFICAÇÃO

### 2.2.1 As Espiroquetas

A ordem Spirochaetales inclui a família Spirochaetaceae e Leptospiraceae, cujos gêneros de importância em animais e humanos são: *Serpulina*, *Treponema* e *Borrelia* (família Spirochaetaceae) e *Leptospira* (família Leptospiraceae) (ANEXO 6). Como o próprio nome define, as espiroquetas são formas bacterianas gram-negativas que se apresentam como espiras delgadas, móveis, flexíveis, unicelulares, medindo de 0.1 a 0.3µm de diâmetro e 6 a 20µm de comprimento. A parede externa da célula bacteriana é composta por uma membrana completamente coberta de flagelos periplasmáticos que compõe o filamento axial ou endoflagelo, o qual permite movimentos de saca-rolhas (spin) e de flexão-extensão facilitando a mobilidade bacteriana no ambiente. O cilindro helicoidal (corpo celular) consiste de material nuclear, citoplasma, membrana citoplasmática e a porção de peptidoglicano da parede celular. O flagelo periplasmático é envolvido pelo cilindro e está no espaço periplasmático celular. A porção final de cada flagelo está inserida próxima a um pólo de cilindro protoplasmático firmemente aderido por estruturas denominadas discos de inserção. O ponto distal de cada flagelo se estende para o centro da célula e pode se sobrepor por flagelos originados no pólo oposto (QUINN *et al.*, 1994) (ANEXO 1 e 2).

### 2.2.2 *Leptospira interrogans*

No gênero *Leptospira* estão incluídas tanto as formas livres (não patogênicas) quanto as formas parasitárias (patogênicas) onde as duas espécies principais deste gênero eram subdivididas em: *L. interrogans* (parasita) e *L. biflexa* (saprófita) (FORBES *et al.*, 1998; ACHA; SZYFRES, 2001).

À medida que as técnicas de diagnóstico molecular foram se aperfeiçoando, os membros deste gênero passaram a ser classificados através de hibridização do DNA, por YASUDA *et al.* (1987) que definiram primeiramente mais de seis espécies com diferentes genomas. Podem ocorrer sorovares patogênicos e não patogênicos pertencendo à mesma espécie. Estudos recentes demonstraram também

heterogenicidade genética entre os sorovares (BAROCCHI *et al.*, 2001; OLIVEIRA; PIRES NETO, 2004).

Atualmente, a diversidade taxonômica da *Leptospira* está baseada em análises de DNA, compreendendo 11 espécies, subdivididas em 31 sorogrupos, sendo estes compostos de mais de 250 sorovares identificados laboratorialmente através de suas composições antigênicas (BAROCCHI *et al.*, 2001) (ANEXO 3, 4 e 5).

À microscopia observa-se morfologia em espiral, e freqüentemente um gancho nas extremidades da célula bacteriana e por isto denominada por Stimson, de *Spirochaeta interrogans* por assemelhar-se a um ponto de interrogação.

Fisiologicamente as formas saprófitas diferenciam-se das patogênicas pela sua facilidade de crescer a 10°C ou até 5°C menos que a temperatura requerida para as patogênicas (BARON *et al.*, 1994). As patogênicas também reagem positivamente ao teste de conversão de células espirais em formas esféricas, pela adição de um molar (1M) de cloreto de sódio (NaCl), à temperatura de 20 a 30°C em 2 horas (QUINN *et al.*, 1994).

O agente infeccioso é sensível à luz solar direta, aos desinfetantes comuns, à dessecação, às variações de pH (não resistem a pH abaixo de 6 ou acima de 8) e à temperaturas superiores a 40°C. Todavia, pode sobreviver por vários dias em água (comprovadamente por até 180 dias) com pH neutro (7,2 a 7,4) e em solos com grande umidade, demonstrando sua preferência por estes locais. No entanto, só resistem a 30 minutos quando o solo está seco. No solo com condições ideais de umidade, a sobrevivência da *L. interrogans* provavelmente é de no mínimo 42 dias. Rios e lagos podem ser fontes de infecção, assim como aerossol de urina em estábulos, leite e sêmen de animais infectados. Sobrevivem também ao frio e mesmo ao congelamento (100 dias a 20°C negativos), mas a temperatura ideal do ambiente é de 25 a 28° C (DICKESON; LOVE, 1993; QUINN *et al.*, 1994; GARCIA; MARTINS, 2004).

O cão é o hospedeiro primário das espécies *L. canicola* e *L. bataviae*, geralmente associadas aos sinais clínicos mais graves. Apesar de menos freqüente, o cão pode também ser um hospedeiro acidental das outras espécies de *leptospira*, como *L. grippotyphosa*, *L. pomona*, *L. icterohaemorrhagiae* e *L. bratislava* (HARTMAN, *et al.*, 1984; CIVES, 2005). Análises sorológicas realizadas na França,

durante os últimos anos, têm demonstrado que o sorovar *icterohaemorrhagiae* é o que mais vem prevalecendo entre os cães, bem como, em seres humanos (ANDRÉ-FONTAINE; GANIÈRE, 19\_?).

### 2.3 EPIDEMIOLOGIA

A Leptospirose é uma enfermidade de distribuição mundial. Tem sido detectada em praticamente todos os países que realizam investigações adequadas. Possui sorovares universais, como por exemplo, *L. interrogans*, sorovar *icterohaemorrhagiae* e sorovar *canicola*, bem como, aqueles que se apresentam somente em determinadas regiões. Cada região caracteriza-se por manter um sorotipo determinado pela sua ecologia. É de alta prevalência nos países tropicais onde há grandes precipitações pluviais e onde o solo é neutro ou alcalino (ACHA; SZYFRES, 2001).

Teoricamente, qualquer mamífero pode ser infectado pela *L. interrogans*. De uma maneira geral, a *L. interrogans* pode infectar inclusive répteis, anfíbios, peixes, pássaros e invertebrados. O homem torna-se infectado através de contato direto ou indireto com a urina ou sangue de animais infectados (FORBES *et al.*, 1998).

A doença é mantida na natureza por portadores com infecção crônica e pela presença bacteriana nos túbulos renais de hospedeiros adaptados. Nestes, a infecção é mantida independentemente das condições ambientais (OLIVEIRA; PIRES NETO, 2004). O sorovar adaptado à determinada região pode tornar-se apto a infectar uma ou mais espécies, como também pode infectar acidentalmente (THIERMANN, 1984) (ANEXO 7 e 8).

BLOOD e RADOSTITS (2002), classificam a epidemiologia da leptospirose de duas formas com relação ao hospedeiro: a forma “adaptada ao hospedeiro”, “hospedeiro de manutenção” ou “reservatório”, onde o animal não desenvolve a doença. E a “não adaptada ao hospedeiro”, onde este é susceptível a doença, resultando em doença acidental. No primeiro caso, o hospedeiro é passível de infecção e de transmissibilidade a outras espécies. A patogenicidade é baixa, com fraca resposta a imunização e com tendência a provocar doença crônica. O hospedeiro acidental é caracterizado pela doença aguda, resposta eficiente às

vacinas, alta patogenicidade e alto título de anticorpos facilitando o diagnóstico sorológico.

É considerada como uma doença ocupacional, com grande prevalência em pecuaristas. A leptospirose em humanos acomete principalmente trabalhadores rurais, fazendeiros, magarefes e veterinários (DICKESON; LOVE, 1993; SNASHALL, 1996; RENDE; ÁVILA, 2003). Em países desenvolvidos a leptospirose está associada com atividades recreacionais aquáticas (NASCIMENTO *et al.*, 2004). Segundo ÁVILA *et al.* (1998), atualmente a leptospirose já não pode mais ser relacionada apenas com atividades profissionais, mas com o *status* econômico, haja vista a situação de miséria em que vive grande parte da população dos países de terceiro mundo, aumentando a proliferação de roedores facilitando o convívio destes com os animais domésticos e com o próprio homem.

TAVARES NETO *et al.* (1996), registraram a prevalência de soros reagentes em 45,3%, das 106 amostras provenientes de pessoas da zona rural. A forma de contágio humano, provavelmente ocorre pelo contato com a urina ou conteúdo uterino dos animais infectados. Apesar das leptospirosas poderem estar presentes no leite por poucos dias durante o pico febril, em caso de infecção aguda, a bactéria não sobrevive muito tempo no leite, não resistindo igualmente à pasteurização. Entretanto, os trabalhadores das fazendas que realmente ordenham as vacas, são altamente suscetíveis à infecção pela *L. interrogans* sorovares *hardjo* e *pomona*.

A apresentação em animais concentra-se primeiramente nos roedores silvestres e domésticos e em aproximadamente 160 espécies de mamíferos. Cada sorovar possui o seu hospedeiro predileto, mas cada espécie animal pode ser hospedeira de um ou mais sorovares. Como exemplo, o sorovar *pomona* que tem como hospedeiro principal o gado bovino, podendo infectar de forma transitória outras espécies de animais (ACHA; SZYFRES, 2001)(ANEXO 7 e 8).

Reservatórios podem apresentar o fenômeno de leptospirose por toda a vida, com taxa de portadores chegando a 50% ou mais. Animais domésticos, geralmente, eliminam leptospirosas intermitentemente, por meses, podendo chegar a um ano, com declínio na intensidade (RUSSELL; RUSSELL, 1994).

A alta incidência de reagentes a infecção bovina, como relatado por RENDE e ÁVILA (2003), com taxas cujas frequências variam de 58,6% e 57,3%, respectivamente, em bovinos de leite e corte na região de São Paulo, também

mostrou-se alarmante, pois a doença clínica nesses animais compromete o desempenho reprodutivo por causar abortamento, natimortalidade, nascimento de crias fracas e inviáveis, além de queda na produção de leite e custos relacionados à assistência veterinária, medicamentos, vacinas e testes laboratoriais para diagnósticos (VASCONCELLOS *et al.*, 1993; BLOOD; RADOSTITS, 2002).

GENOVEZ *et al.*, (1993), trabalhando com fetos abortados isolaram bactérias causadoras de aborto bovino tendo identificado a *Brucella abortus* em 6.4% dos casos, *Leptospira interrogans* em 6.2% e *Staphylococcus aureus* em 5.4% como os principais agentes abortivos.

Suínos, com frequência, são infectados pelo sorovar *L. pomona*, mas recentes estudos indicam a importância do sorogrupo *L. australis* causando aborto e infertilidade. Apesar de mais resistentes, rebanhos de ovinos também são acometidos pela infecção onde se pode relatar agalactia, aborto e distúrbios reprodutivos (THIERMANN, 1984).

Em vários locais do mundo, investigações sobre a presença de sorovares de *Leptospira interrogans* em animais silvestres têm sido demonstradas em roedores, edentatas, carnívoros e artiodáctilos, os quais podem atuar como fonte de infecção (MICHNA, 1970). Os mamíferos da Ordem Carnívora são espécies importantes na cadeia epidemiológica devido as suas funções no equilíbrio dos ecossistemas, de uma maneira geral, onde são o topo da cadeia alimentar. São assim, indicadores de saúde ambiental e por este motivo, não pode ser desconsiderada a sua importância na transmissão da leptospirose para o homem (GUERRA NETO *et al.*, 2004).

Estudos revelaram a baixa ocorrência de infecção por leptospirose em gatos. A virulência varia entre as cepas. Evidências sorológicas indicam que uma variedade de cepas pode infectar gatos, mas a doença demonstra ser incomum nestes animais, nas quais, os microorganismos parecem não tomar parte na infecção renal nesta espécie.

LANGONI *et al.* (1998), detectaram a presença de anticorpos aglutinantes em gatos em nove amostras (4,5%) com títulos que variaram de 100 a 400, sendo que 4 (44,4%) reagiram para o sorovar *L. icterohaemorrhagiae*, 2 (22,2%) para o sorovar *L. patoc*, 1 (11,1%) para *L. canicola*, 1 (11,1%) para *L. grippityphosa* e 1 (11,1%) para *L. andamana*.

DICKESON e LOVE (1993), não acharam diferença significativa de prevalência de soros reagentes na população canina em relação à felina. Das 107 amostras positivas obtidas dos procedimentos de rotina dos Hospitais Veterinários da Austrália, 16,9% dos soros eram de gatos, 9,8% de cães e 28,6% de cavalos.

Dentre os animais domésticos sujeitos a infecção por *Leptospira*, os cães destacam-se como os mais susceptíveis a ela. Em filhotes é alta a letalidade exterminando ninhadas inteiras e o seu aparecimento, geralmente súbito, não permite nem mesmo que se possa tomar alguma medida, quer seja curativa ou preventiva (GENOVEZ, 1996).

Atualmente, o cão também desponta como a principal fonte de infecção humana devido a sua relação e convívio estreitos, que crescem a cada dia. Esta importância perde apenas para os roedores, reservatórios naturais da doença, que, histórica e epidemiologicamente sempre assumiram posição de destaque como fonte de infecção para os humanos e outros animais. Dentre os roedores “domésticos”, as espécies mais comuns são: *Rattus norvegicus* (ratazana, rato de esgoto ou gabiru), *Rattus rattus* (rato de telhado, rato preto) e *Mus musculus* (camundongo ou catita). Nas zonas rurais, embora as três espécies sejam prevalentes, podemos encontrar pequenos roedores do campo chamados, genericamente, ratos da lavoura ou ratos do campo representados, principalmente, pelo *Holochillus sp.* Os animais de vida livre que são predadores para estes roedores, não parecem exercer um papel relevante na rota natural de transmissão da infecção (RENDE; ÁVILA, 2003).

No Brasil, inquéritos soro-epidemiológicos em vários estados têm revelado resultados variados quanto à ocorrência dos diferentes sorovares na leptospirose canina (GENOVEZ, 1996; ÁVILA *et al.*, 1998; ALVES *et al.*, 2000; FAVERO *et al.*, 2002). Segundo ÁVILA *et al.* (1998), os principais sorovares encontrados em cães, no município de Pelotas-RS, no ano de 1995 foram: *L. canicola* (58,1%); *L. icterohaemorrhagiae* (20,9%); *L. copenhageni* (11,4%); *L. grippityphosa* e *L. castellanis* (2,7%); *L. andamana*, *L. autumnalis* e *L. pyrogenes* com 1,4% dos reagentes, onde 34,8% foram reagentes positivos com títulos maiores ou iguais a 1/100. Corroborando com os achados de YASUDA e SANTA ROSA (1981), notificando prevalência do sorovar *canicola* como sendo o melhor adaptado aos cães depois de ter isolado 91,4% deste sorovar, seguido dos sorovares *copenhageni*

(5,7%) e *pomona* (2,8%), durante os anos de 1976 e 1977, na cidade de São Paulo-SP.

## 2.4 PATOGÊNESE

As portas de entrada para estas delgadas bactérias são as mucosas oral, nasal, conjuntival e genital, além de pele e tecidos lesados. Também podem penetrar através da pele íntegra após esta ter ficado por longa exposição na água, permitindo a dilatação dos poros. A transmissão se dá através de contato direto ou indireto com solo úmido, água, tecidos, urina e sangue contaminados. A via oral é pouco eficiente por serem as bactérias sensíveis ao pH ácido do estômago dos animais e seres humanos. O período de incubação é de uma a duas semanas (GARCIA; MARTINS, 2004).

Raramente a doença é transmissível através de mordidas de animais, assim como a transmissão direta entre seres humanos (LEVETT, 2001).

A patogênese, de modo geral, é semelhante em cães e seres humanos. Uma infecção generalizada inicia-se com o desenvolvimento da lesão ocorrendo quando uma concentração crítica de bactéria é alcançada. Como se desenvolve uma resposta imune mediada por anticorpos ao sorovar infectante, os microorganismos são eliminados pelo sistema imune do hospedeiro, exceto aqueles sítios seqüestrados, como globo ocular, cérebro e rins, onde persistem por vários meses. Nos rins, multiplicam-se nos túbulos coletores sendo eliminados pela urina. Infecções nos reservatórios são, usualmente, de inaparentes ou moderadas e o fenômeno de leptospirúria persiste por tempo prolongado (RUSSELL; RUSSELL, 1994).

A *L. interrogans* pode causar infecções subclínicas, como sintomatologia gripal branda, bem como, provocar doenças sistêmicas graves que podem levar a morte. A severidade da doença é influenciada pelo número de microorganismos presentes no hospedeiro, pela virulência do sorovar e pelo *status* imunológico do infectado. Desta forma, espalham-se no hospedeiro pela corrente sanguínea, tecidos e sistema nervoso central. Multiplicam-se rapidamente e causam lesões nos endotélios de pequenos vasos causando hemorragias, sendo então, responsáveis

pelas manifestações clínicas de doenças como meningites e disfunções hepáticas e renais (MURRAY *et al.*, 1998).

A fase de localização hepática e renal é, provavelmente, resultado da capacidade de aderência das leptospiros virulentas às diferentes células, além da capacidade de penetração através das células endoteliais e da dissociação dos hepatócitos. É esta interação celular que dá origem às coagulopatias, hipóxia tecidual e agregação plaquetária com ativação do sistema de coagulação e fibrinólise (ANDRÉ-FONTAINE; GANIÈRE., 19\_?).

Também penetram no útero grávidico e multiplicam-se nos fetos, podendo levar a morte e reabsorção fetal, aborto ou prole fraca. No feto bovino, se a infecção acontecer durante o terceiro trimestre, pode ocorrer produção de anticorpos específicos que, ocasionalmente, superam a manifestação da doença (QUINN *et al.*, 1994).

Algumas cepas produzem hemolisina que é, provavelmente, a responsável pela hemoglobinúria em animais infectados. Proteínas citotóxicas também são produzidas por cepas virulentas, mas a função destas toxinas ainda é desconhecida (QUINN *et al.*, 1994).

A ação tóxica bacteriana ainda não está bem compreendida. Sabe-se que, a atividade hemolítica é dependente dos fosfolipídios da membrana dos glóbulos vermelhos que podem ser sensíveis, ou não a fosfolipase produzida pelas leptospiros (ANDRÉ-FONTAINE; GANIÈRE., 19\_?).

A hemolisina produzida na fase septicêmica pode estar em quantidade suficiente para provocar extensa hemoglobinúria, resultante de hemólise intravascular intensa. Essa hemólise dependerá da capacidade de um sorotipo em produzir hemolisinas como ocorre com o sorovar *ballom*, em hamsters e o sorovar *pomona*, em bovinos (BLOOD; RADOSTITS, 2002).

Os sorovares *pomona* e *copenhageni* elaboram uma proteína citotóxica cuja atividade é detectada no plasma dos animais infectados que provoca infiltrações de macrófagos e outras células polimorfonucleares em órgãos afetados (LEVETT, 2001).

Entre o 4<sup>o</sup> e 11<sup>o</sup> dia de infecção, a bactéria invade a corrente sangüínea multiplicando-se rapidamente, dando origem a leptospiremia. No início desta fase observam-se febre, leucocitose e albuminúria. Em animais susceptíveis, pode

ocorrer a septicemia ao dar-se a invasão nos órgãos pelos quais a bactéria tem maior tropismo, como fígado, rins, baço, sistema nervoso central e globo ocular, podendo ocasionar grandes danos teciduais. A *Leptospira* pode provocar petéquias ou equimoses, icterícia, infiltrado inflamatório difuso de células plasmáticas nos rins, necrose focal de parênquima hepático, colestase intra-hepática com lesão hepática severa. Neste estágio da doença o animal poderá sucumbir devido à insuficiência renal ou hepática. Ao final da bacteremia (sete a dez dias após a infecção), geralmente a febre diminui e a bactéria é eliminada da circulação sangüínea devido à presença de anticorpos, o que possibilita a recuperação. Esta é mais rápida quanto menor forem as lesões orgânicas. No entanto, as bactérias que se alojaram em locais onde os anticorpos não têm acesso, como córneas e túbulos renais, podem levar à uveíte e à leptospirúria. O fenômeno de leptospirúria ocorre em uma fase mais tardia da enfermidade. Ela pode permanecer por meses, até mesmo anos, constituindo-se uma fonte de contaminação ambiental e de infecção para os outros animais. Nesses animais portadores e eliminadores da bactéria, a concentração de anticorpos decai, já que o microorganismo se encontra situado nos túbulos renais, não estimulando o sistema imune podendo apresentar-se soronegativos quando testados (CIVES, 2005).

ACHA e SZYFRES (2001) descrevem a doença no homem e nos animais, particularmente bovinos e cães, da seguinte maneira:

- Em seres humanos em geral, distinguem-se dois tipos clínicos: o anictérico, que pode ser discreto, sendo freqüentemente rotulado de “síndrome gripal” ou “virose”; e o icterico ou hepatonefrítico (Doença de Weil) tipo clínico mais grave, com disfunção renal, fenômenos hemorrágicos, alterações hemodinâmicas, cardíacas, pulmonares e de consciência, associadas a taxas de letalidade que variam de 5% a 20% nas diversas casuísticas. Na forma clássica da Doença de Weil os sintomas se instalam bruscamente com febre, dores de cabeça, mialgias, conjuntivites, náuseas, vômitos, diarréias e constipação. A prostração é marcante. Petéquias na pele, hemorragias gastrointestinais e proteinúria são comuns. Se o paciente evolui até a cura, a diurese se restabelece e diminui a icterícia. Qualquer sorovar pode determinar as diversas formas de apresentação clínica, sendo que alguns estão mais comumente relacionados a casos mais graves, como o sorovar *icterohaemorrhagiae*. Na forma anictérica muitas vezes o curso é benigno e o paciente se recupera dentro de um mês.
- Em bovinos têm-se isolado mais de 13 sorovares onde os universais são *pomona* e *hardjo*, este último vem se comprovando com cada vez mais freqüência. A infecção pode se dar na forma aguda, subaguda ou permanecer clinicamente inaparente. A enfermidade se manifesta por uma febre de quatro a cinco dias, anorexia, conjuntivite e diarréia. A leptospiremia começa a desaparecer quando se formam os anticorpos, desaparecendo as leptospiras da corrente sangüínea em uma semana devido a imunidade humoral. As leptospiras sobreviventes alojam-se nos túbulos convolutos dos rins e a infecção passa a uma fase crônica. Nos primeiros meses a leptospirúria elimina grandes quantidades de leptospiras diminuindo ou cessando com o tempo. O sorovar

*hardjo*, cuja leptospirúria é mais prolongada que o *pomona*, caracteriza-se por causar agalactia, ou redução de leite e abortos ou crias fracas. Infecções por *hardjo* podem residir nos órgãos genitais o que pode indicar transmissão venérea. A infertilidade pode ser seqüela da infecção. Em casos graves há icterícia. São susceptíveis animais de todas as idades, sendo mais severa em bezerros.

- Nos cães os sorovares predominantes no mundo são *canicola* e *icterohaemorrhagiae*. A infecção pode variar desde uma forma assintomática até quadros clínicos mais graves. A hemorrágica é a forma mais grave, instalando-se repentinamente em três a quatro dias com sinais de febre seguida por rigidez e mialgias dos membros posteriores, hemorragias na cavidade bucal podendo levar a necrose e faringite, seguidas posteriormente de hemorragias gastrointestinais, nefrite aguda e icterícia.

A icterícia ocorre principalmente devido à lesão hepática e não à hemólise intravascular. Os rins começam a ter problemas de filtração ocorrendo a seguir quadro de uremia onde o animal apresenta hálito de amônia. Este é o quadro agudo da doença no homem e no cão com duração de quatro a sete dias (GARCIA; MARTINS, 2004).

Além da ocorrência de hemorragia difusa, de anemia e icterícia, os animais também apresentam na leptospirose aguda, edema pulmonar, fígado pálido, friável e corado por bile. Os rins aparecem tumefeitos e escuros devido à impregnação hemoglobínica. Mais tarde, no curso da doença, os rins apresentam focos pálidos causados por infiltrados de células inflamatórias no interstício. As hemorragias são numerosas e disseminadas. Diante do envolvimento hepático é notável em cães a hepatomegalia, onde o fígado também se apresenta friável e com coloração amarelo-acastanhado. Frequentemente os tecidos estão ictéricos. O fígado pode não exibir alterações notáveis, presumivelmente porque a disfunção hepática pode ser causada por toxina que produz, basicamente, lesão subcelular. A infecção crônica com o sorogrupo *grippotyphosa* tem-se caracterizado por hepatite crônica, fibrose hepática e a presença do microorganismo no fígado. A infecção persistente e a hepatite crônica parecem ser raras com este sorovar, porque apenas poucos artigos documentaram este desfecho. Cães que morrem de leptospirose aguda representam hemorragias disseminadas e necrose hepática focal. Os rins consistentemente apresentam lesões e, na forma aguda da doença, estão tumefeitos e apresentando hemorragias equimóticas subcapsulares e corticais. Mais tarde, no curso da doença crônica, tornam-se diminuídos de tamanho com aderências capsulares à superfície cortical e vários graus de fibrose cortical (GREENE, 1998).

O sorogrupo *icterohaemorrhagiae* está associado à lesão hepática, enquanto o sorogrupo *canicola* está associado à insuficiência renal, com rins hipertrofiados e pálidos. Acredita-se que a infecção por outros sorotipos seja, na maioria das vezes inaparente, embora a infecção persistente com o *L. interrogans*, sorogrupo *grippotyphosa* tenha sido associada à hepatite crônica em cães (GREENE, 1998).

## 2.5 SINAIS CLÍNICOS

A severidade dos sinais clínicos em cães depende da idade, *status* vacinal, virulência do sorovar, da rota de infecção e do grau de exposição. As formas clínicas podem variar de hiperaguda, aguda, subaguda, crônica e assintomática. Raças de cães acima de 15 kg, agravados pelo fato de viverem ao ar livre, são mais afetadas. Uma infecção hiperaguda decorrente de uma leptospiremia massiva pode levar a morte e ocorrer sem o aparecimento de sinais prévios (GREENE, 1998).

A leptospirose canina afeta animais de diferentes raças ou idades e de ambos os sexos. A doença possui um espectro extremamente amplo, indo de uma infecção subclínica a uma síndrome severa de vários órgãos com alta mortalidade. Pode manifestar-se inicialmente com sinais de letargia, febre, vômito, diarreia, mialgia evoluindo para petéquias e sufusões em mucosas, icterícia e dores abdominal e lombar (GREENE, 1998; ACHA; SZYFRES, 2001; LEVETT, 2001).

Segundo GENOVEZ (1996), os sorovares *icterohaemorrhagiae* e *canicola*, prevalentes em cães, determinam aspectos clínicos distintos. Em ambos verifica-se infecção aguda com febre de 39.5 a 40° C, calafrios, conjuntivite e fraqueza como os primeiros sinais. Após, surgem os vômitos, a desidratação e o colapso periférico vascular.

No caso do sorovar *canicola* é comum a evolução para as formas aguda ou subaguda, onde no primeiro caso é também conhecida como Doença de STUTTGART, atingindo níveis críticos de desidratação (10 a 15%), melena, devido as hemorragias intestinais; odor oral fétido, devido às estomatites e glossites, que evoluem para necrose da mucosa e perda do bordo anterior da língua. A taxa de letalidade é elevada, com óbitos ocorrendo entre 36 horas e quatro dias. Sinais de

nefrite, súbitos de febre, edema renal sensível à palpação e morte são freqüentes na forma subaguda deste sorovar.

O sorovar *icterohaemorrhagiae* também é responsável pela forma hiperaguda da doença, denominada Síndrome de Weil canina. É de evolução mais fulminante que a precedente e em cerca de dois dias após o aparecimento dos primeiros sinais, ocorre visível piora do estado geral do animal. As dores musculares ou a hiperestesia paraespinal limitam o animal em seus movimentos, o que GREENE (1998) atribui como uma conseqüência da inflamação muscular, meningeal ou renal.

A temperatura corporal pode cair abaixo da normalidade (36° C) e são visualizadas hemorragias por lesão vascular, principalmente das mucosas oral e conjuntival, bastante ictéricas, com saliva espessa e sanguinolenta (GENOVEZ, 1996). A lesão renal severa evolui para insuficiência renal aguda com poliúria, oligúria ou anúria e conseqüente uremia. A icterícia é responsável pela eliminação da urina rica em bilirrubina e albumina (ANDRÉ-FONTAINE; GANIÈRE., 19\_?).

A morte ocorre em 85% dos casos não tratados e pode ser abrupta dentro de algumas horas ou dias (GENOVEZ, 1996).

A icterícia ocorre mais freqüentemente na fase aguda da doença, relacionada às infecções pelo sorovar *icterohaemorrhagiae*. Nesta fase podem ser observadas fezes de coloração acinzentada, em virtude da colestase hepática resultante de uma inflamação no fígado. Os cães com hepatite ativa crônica manifestam sinais de inapetência, perda de peso, ascite e, em casos crônicos, hepatoencefalopatia. As manifestações pulmonares, como a pneumonia intersticial, são menos freqüentes em cães do que em seres humanos, sendo acompanhadas de respiração difícil e tosse. Já, as intussuscepções ocorrem mais vezes nestes animais associadas com inflamações gastrointestinais (RIBEIRO *et al.*, 2003).

SHCREIBER *et al.* (2005), inocularam cepas virulentas de *L. icterohaemorrhagiae* e de *L. canicola* em cães do grupo controle, que não receberam a pré-imunização com bacterinas comerciais destes sorovares. Observaram os seguintes sinais clínicos: hipotermia (35.6° C), depressão, anorexia, dor abdominal, desidratação, icterícia e perda de peso. Na hematologia, foram verificadas leucocitose e trombocitopenia, enquanto na análise bioquímica, aumento

nas taxas de uréia, creatinina e bilirrubina total, além de lesões como petéquias e nefrite subaguda.

Em gatos os sinais clínicos são raros e variam de suaves a inaparentes mesmo na presença de leptospiremia e leptospirúria e inflamações renais e hepáticas (GREENE, 1998; ACHA; SZYFRES, 2001).

LARSSON *et al.* (1985), com o objetivo de verificar a susceptibilidade dos felinos à infecção por leptospirose constataram que, dos dez gatos inoculados com os sorovares *icterohaemorrhagiae* e *canicola* nenhum deles apresentou sinais clínicos nem laboratoriais e, 90 % apresentaram aglutininas antileptospíricas após a inoculação bacteriana, que ainda eram detectáveis na urina por até 12 semanas.

Trabalho de NAVARRO *et al.* (1981) ao inocularem *Leptospira interrogans* sorovar *icterohaemorrhagiae* em cinco cães, observaram sinais clínicos diferentes que variavam de febre, como única manifestação inicial detectável, até severa icterícia, uremia e morte. À necropsia, foram detectadas petéquias na mucosa intestinal e hemorragia subpleural nos pulmões.

NAVARRO e KOCIBA (1982) dando seqüência a estes estudos verificaram entre os dez cães inoculados com *Leptospira interrogans* sorovar *icterohaemorrhagiae*, que três desenvolveram a forma subclínica com febre persistente de 39,4 a 40.5° C, durante três dias. Quatro animais desenvolveram a forma branda, com febre mais persistente, suave icterícia, esclera congesta e início de desidratação. E os três últimos animais fizeram a forma severa da doença com sintomas de febre alta, anorexia, icterícia, diarréia, depressão até a morte no sétimo dia pós-inoculação.

## 2.6 DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO DA LEPTOSPIROSE

Segundo TIZARD (1998), as respostas imunológicas podem auxiliar na obtenção do diagnóstico da doença de duas formas. Primeiramente, de forma direta, através de anticorpos específicos que identificam ou detectam o antígeno em tecidos, líquidos ou órgãos do animal infectado. Ou então, de forma indireta, detectando-se o anticorpo específico no soro que acusará se houve ou não exposição do animal ao agente infeccioso. A presença de anticorpos no soro de um

animal indica a exposição prévia a um determinante antigênico. Entretanto, esta forma indireta de diagnóstico, não propicia automaticamente uma prova de que existe infecção ativa. Em geral, testes imunológicos utilizados em diagnóstico de infecções bacterianas ou virais, variam em sensibilidade, especificidade, e complexidade de execução, muitas vezes exigindo alto grau de destreza técnica e sofisticados equipamentos necessários para a sua realização.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2003), os métodos laboratoriais atualmente em uso para o diagnóstico da leptospirose incluem: provas sorológicas de detecção de anticorpos (ELISA, Fixação de Complemento, Soroaglutinação Microscópica), Cultura da bactéria, visualização através de Microscopia de Campo Escuro, Microscopia de Imunofluorescência, e mais recentemente, métodos genéticos utilizados somente em grandes centros que dominem as técnicas de Hibridização de DNA, Endonucleases de Restrição e a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).

Os resultados de testes sorológicos aplicados ao diagnóstico da leptospirose dependem da técnica empregada, da coleção de antígenos utilizada, do ponto de corte da reação e também de variáveis relacionadas à localização das propriedades, período do ano em que as colheitas foram efetuadas e da movimentação dos animais (FAINE *et al.*, 1999).

Quando ocorre o fenômeno da leptospiemia a bactéria é comumente encontrada no sangue periférico, fluido cerebrospinal, urina e tecidos podendo ser colhidos em diferentes fases da infecção. Estas células bacterianas apresentam movimentos serpentiformes e são melhor visualizadas pelo exame de líquidos em microscopia de campo escuro, onde aparecem como espirilos delgados apresentando extrema mobilidade. Este tipo de pesquisa pode ser realizado a partir de uma gota de sangue, até o quarto dia de infecção, ou de uma amostra de urina, entre a primeira e segunda semana. A demonstração de microorganismos através de microscopia de campo escuro em líquidos orgânicos e emulsões teciduais, colhidos à necropsia, requer que os tecidos estejam frescos. A *Leptospira* pode ser excretada na urina intermitentemente e títulos de anticorpos, nesses animais portadores podem variar consideravelmente, dificultando o diagnóstico correto (MURRAY *et al.*, 1998).

BLOOD e RADOSTITS (2002) defendem que o exame de amostra urinária representa a melhor oportunidade para a demonstração da infecção. Após a infecção inicial, um grande número de leptospiras é eliminado na urina por diversas semanas, com declínio progressivo em seguida, que pode estar associado com um aumento considerável dos títulos de anticorpos antileptospiras, das classes IgG e IgA, na urina.

A técnica de isolamento do microrganismo por cultivo ou inoculação de material suspeito em animais de laboratórios requer a presença de organismos vivos e a sua multiplicação pode levar semanas até que se chegue a um resultado conclusivo. Esta dificuldade de ordem prática desestimula a utilização deste tipo de diagnóstico, principalmente se o objetivo for verificar o estado de portador renal de leptospiras (YASUDA; SANTA ROSA, 1981; RIQUELME, 1985; RENDE; ÁVILA, 2003)

Por se tratar de uma doença que não apresenta sinais patognomônicos, faz-se necessário aliar os exames laboratoriais ao diagnóstico clínico a fim de serem tomadas medidas que possam evitar uma epidemia, já que a eficácia do tratamento vai depender do diagnóstico precoce da doença (RIBEIRO *et al.*, 2003).

Em relação aos métodos de diagnóstico laboratorial destacam-se: os gene-específicos e os sorogrupo-específicos (LEVETT, 2001).

O teste de Soroaglutinação Microscópica (SAM) ou teste Microscópico de Aglutinação (MAT), é sorovar-específico sendo a técnica de referência padrão mais utilizada por pesquisadores de todo o mundo para o diagnóstico da leptospirose devido a sua praticidade, rapidez de execução, baixo custo e baixo risco de infecção para o operador (SANTA ROSA, 1970).

O teste Microscópico de Aglutinação (MAT) é realizado colocando-se frente a frente microorganismos vivos, juntamente com o soro teste. Caso haja anticorpos no soro, ocorre a aglutinação que poderá ser visualizada pelo aglomerado de leptospiras. É uma técnica excelente para detectar preferencialmente anticorpo IgM conseqüentemente, detectar surtos recentes e distinguir animais infectados de vacinados (TIZARD, 1998).

Esta técnica é indicada pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2003), por apresentar elevada sensibilidade e especificidade.

Seu principal inconveniente é a necessidade de infra-estrutura laboratorial com o emprego de múltiplos antígenos vivos e a necessidade de se manter um grande número de culturas em constante renovação para obtenção de antígenos novos. A demora em até dez dias para que o limiar de aglutininas séricas atinja nível detectável pode implicar no retardo do tratamento, o que pode ser fatal (YASUDA; SANTA ROSA, 1981; RIQUELME, 1985). Para COLE *et al.* (1973) a principal desvantagem desta técnica é que somente leptospiras aglutinantes são observadas.

Apesar de ser uma técnica de uso universal, é difícil obter resultados consistentes e idênticos entre os laboratórios. Anticorpos resultantes do uso de bacterinas multivalentes podem interferir no diagnóstico, que depende de análise subjetiva não diferenciando entre doença e imunização (THIERMANN, 1984).

Para melhor aproveitamento desta técnica, são utilizados *pools* contendo vários sorotipos de *Leptospira* em cada *pool*. Os resultados positivos são visualizados em campo escuro onde se verificam as aglutinações das mesmas. Caso se verifiquem microaglutinações, procede-se a microaglutinação em separado para cada sorovar contido no *pool*. As disponibilidades de reagentes comerciais para a confecção dos meios de cultura facilitam o emprego desta técnica (FORBES *et al.*, 1998).

Para RIBEIRO *et al.* (2003), esta prova requer cuidados em sua interpretação para a obtenção de um diagnóstico definitivo. Como no caso dos animais que apresentarem reações positivas onde pelo menos 50% de *Leptospiras* encontrar-se-ão aglutinadas. Estes soros são testados novamente em diluições ao dobro, até verificar-se ausência da aglutinação para o respectivo sorovar. No entanto, alguns animais podem reagir para vários sorovares ou podem apresentar reações cruzadas com sorovares do mesmo grupo (co-aglutinação), dificultando a interpretação de uma única amostra sorológica. Nestes casos e, sempre que possível, recomenda-se a realização da sorologia pareada, que consiste na execução de duas provas sorológicas intercaladas de duas a quatro semanas. Título maior ou igual a 100, na primeira tomada de sangue, seguido da quadruplicação deste título numa segunda tomada, é uma prova de soroconversão, confirmando assim, a infecção. Títulos elevados da ordem de 1600 ou maiores são considerados significantes, juntamente com dados clínicos compatíveis. Um único exame com título maior ou igual a 100 pode ser interpretado como residual de infecção

pregressa, resposta inicial a uma infecção corrente ou vacinação. Mesmo títulos elevados são questionáveis se a amostra testada advém de animais sujeitos a sucessivas vacinações, pois, títulos vacinais podem ser detectados até três meses após a vacinação. Na avaliação sorológica dos animais é importante questionar o histórico vacinal contra leptospirose. Cães vacinados recentemente podem apresentar resultados falso-positivos, já que anticorpos vacinais não são diferenciados daqueles provenientes de infecção.

O MAT é um teste específico para um sorogrupo e todos os sorogrupos suspeitos devem ser testados. O teste detecta o anticorpo da classe IgM com mais facilidade que o da classe IgG. Na leptospirose crônica, o teste apresenta pouca sensibilidade em detectar hospedeiros de manutenção. Ele também não determina o grau de imunidade à infecção, pois a vacinação promove a elevação de IgG com títulos baixos (100 a 400) e transitórios (um a quatro meses). A imunidade normalmente persiste em animais vacinados por um longo tempo, mesmo após os títulos, obtidos através do MAT, tornarem-se negativos (BLOOD; RADOSTITS, 2002).

Também como diagnóstico, faz-se mister ressaltar o método da Reação em Cadeia Polimerase (PCR), do Centro Nacional de Referência para Leptospirose do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), da FIOCRUZ (2005 in: FAPESP) onde, segundo aqueles pesquisadores, o principal problema das técnicas utilizadas é a demora nos resultados. O exame sorológico só consegue identificar a infecção uma semana após o início dos sintomas da doença, enquanto a cultura das bactérias pode levar até dois meses. O PCR amplifica em escala potencial o DNA bacteriano permitindo o diagnóstico em poucas horas. É capaz ainda de identificar a presença deste DNA mesmo em pessoas ou animais que apresentem poucas bactérias na corrente sanguínea.

O teste de PCR identifica geno-espécies, mas não o sorovar. Tem sido usado para diferenciar sorovares patogênicos dos não patogênicos (SMYTHE *et al.*, 2002; OLIVEIRA; PIRES NETO, 2004).

Métodos sorológicos possuem limitações e por isto, devem ser complementados com o isolamento do agente causal (THIERMANN, 1984; RIQUELME, 1985; WHO, 2003;).

A prova de Imunofluorescência Direta (IFD) valendo-se de rins, trato genital e urina, tem se mostrado uma técnica diagnóstica alternativa mais rápida que as demais. Comparada à técnica de Isolamento, a Imunofluorescência Direta, segundo RIQUELME (1985), detectou maior número de casos positivos recomendando o seu uso como prova complementar ao diagnóstico da leptospirose.

THIERMANN (1983) comparou as sensibilidades apresentadas através das técnicas de MAT e ELISA onde obteve os seguintes resultados: dos 200 soros de bovinos colhidos, observou a presença de reagentes em 29 (14.5%) soros pela técnica de MAT contra 79 (39.5%) pela técnica de ELISA. Ambas as técnicas indicaram *hardjo* como sorovar predominante.

No diagnóstico bioquímico pode-se verificar na hematologia: petéquias e trombocitopenia (em cães severamente afetados), leucocitose com desvio à esquerda (>20.000 leucócitos/dl) e um aumento no fibrinogênio plasmático, além de graus variáveis de anemia. Nas provas bioquímicas podem estar aumentados: nitrogênio sangüíneo proveniente da uréia (BUN), alanina aminotransferase sérica (ALT), desidrogenase láctica sérica (LDH), aspartato aminotransferase sérica (AST), fosfatase alcalina sérica (FA) e bilirrubina sérica. Estes se constituem nos principais exames de monitoramento da evolução do quadro clínico e, conseqüentemente, do prognóstico de animais com leptospirose. A urinálise revela piúria, proteinúria, e/ou bilirrubinúria, densidade baixa e glicosúria, acompanhadas de elevação de cilindros granulados, leucócitos e eritrócitos no sedimento urinário (NAVARRO *et al.*, 1981).

No *pos-mortem* verificam-se hepatomegalia, degeneração e fibrose hepática, congestão pulmonar, petéquias e sufusões pleurais, úlceras na língua, edema, congestão e necrose renal, hemorragias e aderência de cápsula renal, congestão, edema e hemorragias gastrintestinais. Os rins estão aumentados em animais que morrem durante a fase aguda. A necropsia é de grande valia para o diagnóstico. O sorovar *icterohaemorrhagiae* pode provocar pronunciada icterícia de serosas e conjuntivas. O diagnóstico histopatológico é realizado principalmente com base em fragmentos renais ou hepáticos, corados por técnicas de impregnação pela prata (colorações de Gomori, Warthin-Starry ou Levaditti). Rins e fígado constituem-se nos órgãos de eleição para que o agente seja isolado (GREENE, 1998; RIBEIRO *et al.*, 2003).

A histopatologia é melhor visualizada em órgãos como rins, fígado, coração e pulmões, porém outros órgãos podem ser afetados de acordo com severidade da infecção (LEVETT, 2001).

## 2.7 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Em cães, o diagnóstico diferencial inclui (GREENE, 1998):

- Erliquiose e Riquetsiose
- Anemia Hemolítica Auto-Imune
- Hepatite Canina (Doença de Rubarth)
- Brucelose
- Cinomose
- Herpes Vírus
- Piroplasmose

## 2.8 VACINAS

O controle ambiental do agente da leptospirose mostra-se extremamente dificultado pelas características específicas desta bactéria sendo capaz de sobreviver por muito tempo nos solos úmidos, esgotos, banhados e reservatórios de água (NASCIMENTO *et al.*, 2004).

Em razão de ser uma enfermidade que abrange uma ampla variedade de hospedeiros, sua transmissibilidade e as conseqüências que pode gerar, medidas como: vigilância, higiene e, especialmente, a imunoprofilaxia através da vacinação, são as armas mais eficazes utilizadas nos procedimentos de controle da leptospirose (MURRAY *et al.*, 1998). Considerando atualmente em nossa sociedade, a estreita relação do homem com o cão e, a fim de prevenir danos causados por esta doença zoonótica, a imunização ainda é a forma mais contundente de se evitar a infecção humana frente à facilidade de contato direto ou indireto com o animal infectado (THIERMANN, 1983; LEVETT, 2001).

A vacinação humana contra leptospirose não confere imunidade permanente aos imunizados, não sendo ainda praticada ou disponível no Brasil. Em alguns países é utilizada em pessoas sob exposição ocupacional, em áreas de alto risco. A vacinação canina disponível evita a doença clínica mas não impede a infecção nem a transmissão para seres humanos, principalmente através da urina (CIVES, 2005).

Segundo HARTMAN *et al.* (1984), os primeiros experimentos vacinais com cães resultando em sucesso, deram-se em 1926 por Dalling e Okell com cepas inativadas de *icterohaemorrhagiae*, seguidos por Ottosen, em 1946, com o sorotipo *canicola*.

De uma maneira geral, a alta capacidade de proteção e antigenicidade conferida pelas vacinas atenuadas tornaram-nas preferidas quando comparadas com vacinas inativadas, consideradas agentes imunogênicos pobres. Porém, a inocuidade e a ausência de riscos de reversão no seu uso mantém as vacinas “mortas” como uma opção segura e preferida em muitos casos, sendo esta a razão de sua utilização na leptospirose animal (TIZARD, 1998).

No entanto, a exposição de cães vacinados com leptospirosas vivas resulta em rápida elevação de títulos de anticorpos pós-vacinais, que atingem os seus picos com duas semanas após a primeira dose imunoprolifática, dando boa proteção contra o desenvolvimento da doença, apesar dos baixos títulos e da curta duração da resposta imune humoral (KRAMER, 1978; GREENE, 1998).

Diante disto, vacinas com cepas de leptospirosas vivas e atenuadas, apesar de serem capazes de induzir a títulos de anticorpos mais elevados do que os induzidos pelas bacterinas quimicamente inativadas, ainda não conseguiram aceitação dos laboratórios farmacêuticos devido aos riscos inerentes ao seu uso (RUSSELL; RUSSELL, 1994).

De acordo com APPEL (1999), embora a maioria das vacinas comerciais confira segurança e eficácia, existem as exceções onde a doença é induzida pela própria vacina ou não traz a proteção adequada para o animal.

Atualmente, a prevenção da leptospirose em cães se dá através de vacinas provenientes de bacterinas quimicamente inativadas contendo vários sorotipos e seu uso é amplamente disseminado (HARTMAN *et al.*, 1984).

Vacinas contra leptospirose são inativadas em grande parte, por formalina produzidas a partir de leptospirosas patogênicas, contendo um ou mais sorotipos, que

apresentam a desvantagem de induzirem respostas sorológicas baixas e por apenas um curto período de tempo (BLOOD; RADOSTITS, 2002; NASCIMENTO *et al.*, 2004).

BEY e JOHNSON (1982), estudando a imunogenicidade humoral em resposta a vacinas produzidas somente com a membrana externa (ME) da célula bacteriana, cilindros protoplasmáticos (CP) ou células completas (C) de *Leptospira interrogans*, verificaram que as primeiras (ME) produziram melhor resposta humoral sorovar-específica.

Vacinas contra leptospirose com adjuvante completo de Freund induzem a uma maior resposta humoral, não significando necessariamente maior proteção, além de ser um complemento que apresenta características carcinogênicas (TIZARD, 1998; BLOOD; RADOSTITS, 2002;).

O crescimento bacteriano de leptospiros em meios de cultura sintéticos, sem a utilização de soros de animais como forma de enriquecimento nutritivo, tem levado à produção de vacinas sem os riscos usuais, como a ocorrência de reações de hipersensibilidade soro-mediadas que podem levar a um quadro de choque anafilático (BEY; JOHNSON, 1982; BROUGHTON; SCARNELL, 1985).

Na profilaxia das doenças infecciosas caninas, de uma maneira geral, tem-se levado ao uso de vacinas mistas polivalentes, cujo emprego ganhou notoriedade graças a considerável economia de tempo e esforço despendida por parte do veterinário aplicador e do cliente. No entanto, a sua utilização, que na grande maioria abrange antígenos virais atenuados e bactérias mortas, é relativamente complexa, onde muitas de suas vantagens podem ser perdidas no que tange a imunidade conferida, na qual os títulos sorológicos pós-vacinais não são obrigatoriamente homogêneos e igualmente protetores contra todas as doenças a que se propõe o imunógeno (TIZARD, 1998).

Com relação às vacinas empregadas no controle da leptospirose animal, a imunidade conferida a um sorovar é extremamente restrita aos sorovares homólogos ou muito próximos, portanto são sorovares-específicos, não permitindo proteção cruzada, perdendo sua eficácia em relação a outros sorovares (FAINE *et al.*, 1999; LEVETT, 2001). Daí, a necessidade de vacinas polivalentes para a leptospirose.

Vacinas comerciais para cães incluem geralmente os sorovares *canicola* e *icterohaemorrhagiae* (GREENE, 1998). Onde o sorovar *icterohaemorrhagiae*,

segundo BROUGHTON e SCARNELL (1985), apresenta maior antigenicidade. Atualmente, os laboratórios que a produzem já trabalham com a adição dos sorovares *grippotyphosa* e *pomona*.

A utilização de imunógenos para esta enfermidade visa apenas o seu controle. Segundo THIERMANN (1983), nenhum país erradicou a enfermidade. A eliminação completa do patógeno através de vacinas é muito pouco provável, o que se deve não somente ao estado de portador renal, mas também pelas práticas descontinuadas dos esquemas de vacinação, além do envolvimento de animais de vida livre que contribuem na transmissão.

Em muitos casos o sorovar enzoótico predominante em um país, não é conhecido e a ausência do sorovar problema torna a vacinação uma medida ineficaz já que, os anticorpos específicos para cada sorovar não oferecem a proteção adequada e ainda confundem os exames sorológicos (THIERMANN, 1984).

No Brasil, o sequenciamento dos genomas dos sorovares iniciado pelo *copenhageni* realizado pelo Instituto Oswaldo Cruz (RJ), abre a possibilidade de utilização de 23 proteínas na produção de uma nova vacina para leptospirose. Hoje, o sorovar *copenhageni* é o principal responsável pela prevalência da leptospirose no Brasil (2005 in: FAPESP).

BLOOD e RADOSTITS (2002) apresentam como uma desvantagem teórica da vacinação o fato desta proteger contra uma invasão sistêmica, mas não contra a colonização renal, permitindo a ocorrência de uma leptospiúria transitória, fenômeno este que não invalida a vacinação. BOLIN (1991) afirma que a vacinação em bovinos, depois de ocorrida a infecção, não reduz a colonização renal dos infectados. Em contrapartida, especificamente em relação à vacinação canina, nos trabalhos de HUHN *et al.* (1975) e SCHREIBER *et al.* (2005) a sua utilização conferiu boa proteção contra a leptospiremia, leptospiúria e infecção renal.

MARSHALL e KERR (1974) verificaram ausência de leptospiremias e de portadores renais em cães previamente vacinados e posteriormente desafiados com inóculos contendo altas concentrações de *icterohaemorrhagiae*. No entanto, os autores admitem que os resultados obtidos neste aspecto, podem ser diferentes devido a muitas variáveis como no caso de uma infecção prévia na qual já se estabeleceu o *status* de portador renal tendo como conseqüência a manutenção permanente da colonização renal e do estado de portador.

Nos trabalhos de HUHN *et al.* (1975), BEY e JOHNSON (1982), BROUGHTON e SCARNELL (1985) e SCHREIBER *et al.* (2005) nenhum dos cães inoculados pós-imunização, indiferentemente do tipo de vacina ou dosagem, apresentaram sinais clínicos de leptospirose, confirmando a boa proteção vacinal.

Assim, proteger contra a infecção renal é um importante critério de qualidade imunogênica a ser alcançado para uma vacina contra a leptospirose ser considerada eficiente (BEY e JOHNSON, 1982).

O esquema de vacinações caninas, de um modo geral, é um tema polêmico, que causa profundas divergências (APPEL, 1999). Considerando apenas as vacinas inativadas, o intervalo entre as doses de reforço exige reforços freqüentes. Por outro lado, vacinas vivas ao produzirem imunidade mais duradoura podem requerer reforços apenas anuais. Clínicos veterinários recomendam a revacinação anual contra as diversas doenças. Outros recomendam a dose reforço a cada três anos, quando se tratando de vírus. Os fatores que causam tal discussão vão desde a primeira imunização, em detrimento aos níveis de anticorpos maternos, vacinas vivas atenuadas ou vacinas inativadas, até o uso de vacinas polivalentes ou monovalentes (AVMA, 1989; PHILLIPS *et al.* 1989; TIZARD, 1998; APPEL, 1999).

RUSSELL e RUSSELL (1994) sugerem um calendário de imunização onde a vacina contra leptospirose deve ser realizada a cada seis meses. Este procedimento não é usado na prática, visto que, as vacinas comerciais polivalentes associadas com vírus preconizam a revacinação anual. LEWIS *et al.* (1988) recomendam três a quatro doses com intervalo de duas a três semanas, com proteção assegurada por seis a oito meses. FORD (1992), recomenda uma revacinação após duas a três semanas em animais adultos vacinados pela primeira vez.

Com os 23 sorogrupos sorologicamente classificados para *L. interrogans* e divididos em mais de 250 sorovares ainda há muito que ser pesquisado entre as características moleculares desta espécie, pois pouco se sabe a respeito dos seus antígenos protetores (GITTON *et al.*, 1992).

Para RIBEIRO *et al.* (2003), o levantamento da ocorrência de diferentes sorovares como *pomona*, *hardjo*, *grippotyphosa* e *bratislava* induz a relevância da pesquisa continuada no desenvolvimento de novas vacinas contra leptospirose canina e a necessidade de inclusão de novos sorovares, visando a elaboração de vacinas mais eficazes e de respostas mais prolongadas.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS DO EXPERIMENTO

O experimento contou com animais provenientes do Laboratório Experimental da BASF-UFPR, Curitiba-Pr, constituído de 16 cães da raça Beagle sendo 06 machos e 10 fêmeas, todos com idades entre dois e três anos, alimentados com a mesma ração comercial balanceada para manutenção de cães adultos, oferecida duas vezes ao dia e água *ad libitum*, em regime semi-aberto de confinamento.

#### 3.2 IMUNÓGENO UTILIZADO

Foi utilizado como imunógeno bacterina produzida pelo Laboratório Fort Dodge (Duramune Max5-CvK/4L) contendo os seguintes sorovares: *L. icterohaemorrhagiae*, *L. canicola*, *L. pomona* e *L. grippotyphosa*.

Esta vacina comercial liofilizada é polivalente, constituída de cepas virais atenuadas contra as seguintes doenças caninas: Cinomose, Hepatite Infecciosa Canina, Adenovírus Canino Tipo 2, Parainfluenza, Parvovirose e Coronavirose.

As frações *Leptospira* da vacina são preparadas a partir de componentes de membrana externa, através da tecnologia usada para extrair os antígenos altamente imunogênicos das células desta bactéria, designados de O.M.C. (Outer Membrane Complex).

#### 3.3 VACINAÇÕES

O protocolo utilizado consistiu na vacinação de todos os animais no dia considerado zero, realizando-se um reforço vacinal (*booster*) 90 dias após a primo-

vacinação, aplicando-se a dose de um mililitro, por via subcutânea, recomendada pelo fabricante.

### 3.4 COLHEITA DE SANGUE E OBTENÇÃO DE SOROS

No dia considerado zero, foram colhidas amostras de sangue obtidas por punção da veia cefálica utilizando-se seringas descartáveis e agulhas calibre 25/7, no volume de cinco mililitros, sendo alocados em tubos previamente esterilizados.

Uma vez obtido o coágulo, o soro foi centrifugado a 2.000 r.p.m. durante quatro minutos, de modo a obter soros límpidos. O mesmo procedimento foi realizado aos 30, 60, 90, 120, 150, 180 e 210 dias pós-vacinais perfazendo um total de sete colheitas pós-vacinais.

### 3.5 BASE FÍSICA LABORATORIAL

As amostras de soro foram processadas no Laboratório Veterinária Preventiva, em Curitiba-Pr.

### 3.6 TÉCNICA SOROLÓGICA EMPREGADA

As amostras de soro foram submetidas ao Teste de Soroaglutinação Microscópica (SAM) preconizado por COLE *et al.* (1973), padronizado pelo Ministério da Saúde (2001), utilizando-se antígenos vivos cedidos pelo Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti-SEAB-PR, em Curitiba, onde as reações aglutinantes foram testadas frente a cinco sorovares: *canicola*, *icterohaemorrhagiae*, *copenhageni*, *pomona* e *grippotyphosa* utilizando-se as diluições de 1/25, 1/50, 1/100, 1/200 e 1/400. Consideraram-se como soros reagentes aqueles que apresentaram qualquer reação ao teste. Os títulos obtidos foram anotados e comparados com objetivo de elaboração de gráficos das flutuações observadas. Quanto a utilização do sorovar

*copenhageni*, foi devido a literatura, no decorrer do trabalho, ter apresentado um grande aumento da presença deste sorovar na região de Curitiba.

## 4 RESULTADOS

As tabelas a seguir apresentam os resultados dos exames de Soroaglutinação Microscópica realizados nos 16 animais do estudo.

Os títulos de anticorpos aglutinantes foram obtidos nas sete colheitas distintas.

### 4.1 TÍTULOS PRÉ-VACINAIS

Os valores discriminados na Tabela 1 apresentam os títulos de anticorpos pré-vacinais, considerados, então, a partir desta primeira titulação, como dia 0 (zero). Somente as amostras 05, 08, 09, e 11 mostraram-se não reagentes para o sorovar *copenhageni*. Não se obteve reação aglutinante para os sorovares *canicola*, *grippotyphosa*, *icterohaemorrhagiae* e *pomona*.

TABELA 1 – TÍTULOS SOROLÓGICOS, PRÉ-VACINAIS PARA *L. interrogans*, SOROVARES *icterohaemorrhagiae*, *canicola*, *copenhageni*, *pomona* e *grippotyphosa*, DOS 16 CÃES, NO DIA CONSIDERADO 0 (zero)

Animais	<i>L.icterohae morrhagiae</i>	<i>L.canicola</i>	<i>L.copenhageni</i>	<i>L.pomona</i>	<i>L.grippoty phosa</i>
1	-	-	1/25	-	-
2	-	-	1/25	-	-
3	-	-	1/25	-	-
4	-	-	1/25	-	-
5	-	-	-	-	-
6	-	-	1/50	-	-
7	-	-	1/50	-	-
8	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-
10	-	-	1/25	-	-
11	-	-	-	-	-
12	-	-	1/100	-	-
13	-	-	1/25	-	-
14	-	-	1/25	-	-
15	-	-	1/25	-	-
16	-	-	1/25	-	-

FIGURA 1 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PRÉ-VACINAIS PARA *Leptospira interrogans* SOROVAR *copenhageni*

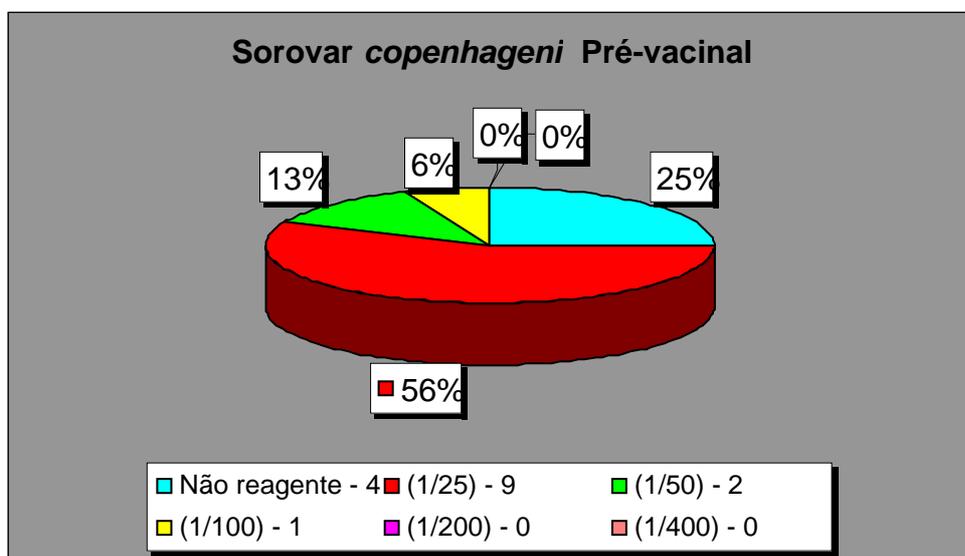
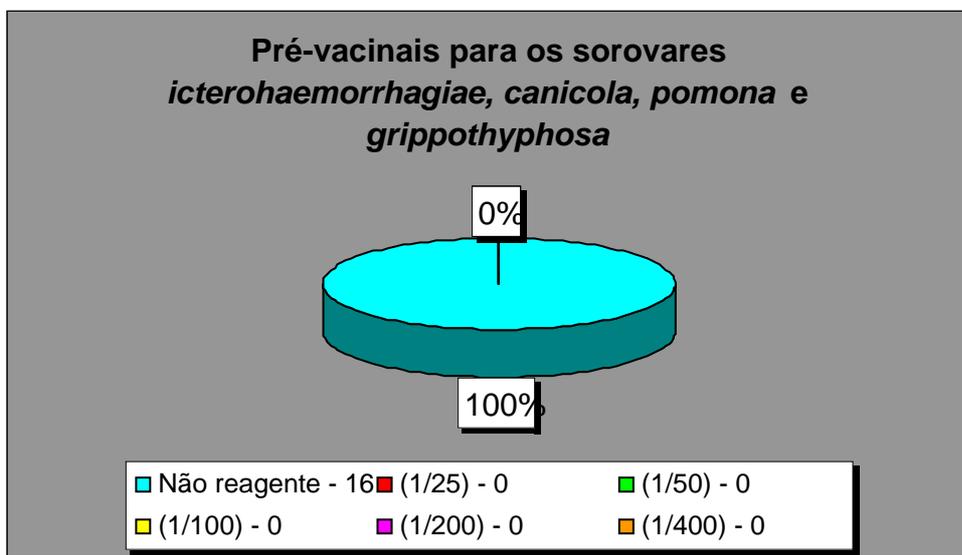


FIGURA 2 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PRÉ-VACINAIS PARA *Leptospira interrogans* SOROVARES *icterohaemorrhagiae*, *canicola*, *pomona* E *grippityphosa*



## 4.2 TÍTULOS PÓS-VACINAIS AOS 30 DIAS

Após 30 dias da administração da vacina comercial os resultados pós-vacinais obtidos para os sorovares *copenhageni*, *canicola*, *pomona* e *grippotyphosa* estão descritos na Tabela 2; Figuras 3, 4, 5 e 6.

Não se observou título aglutinante para o sorovar *icterohaemorrhagiae* (Tabela 2; Figura 7).

As amostras sorológicas pertencentes aos animais números 01, 02, 03, 13 e 16, que no exame pré-vacinal apresentaram títulos 1/25, frente ao sorovar *copenhageni*, tiveram os mesmos aumentados para 1/400. Nas amostras 04 e 10 observou-se uma alteração na titulação pós-vacinal de 1/25 para 1/200. A amostra número 06 evoluiu de 1/50 para 1/200 no pós-vacinal e a amostra número 07 de 1/50 para 1/400. As amostras 05 e 08, inicialmente não reagentes, evoluíram, para 1/200, e as amostras 09 e 11, igualmente não reagentes, aumentaram para 1/400. A amostra 12, com título inicial de 1/100, passou para 1/200. A amostra 14 de 1/25 aumentou para 1/100 e a amostra 15 de 1/25 para não reagente.

TABELA 2 - TÍTULOS SOROLÓGICOS AOS 30 DIAS PÓS-VACINAIS PARA *L. interrogans*, SOROVARES *icterohaemorrhagiae*, *canicola*, *copenhageni*, *pomona* e *grippotyphosa*, DOS 16 CÃES EXPERIMENTAIS

<b>Animais</b>	<i>L.icterohaemorrhagiae</i>	<i>L.canicola</i>	<i>L.copenhageni</i>	<i>L.pomona</i>	<i>L.grippotyphosa</i>
1	-	1/100	1/400	-	1/25
2	-	-	1/400	-	1/25
3	-	-	1/400	1/25	1/25
4	-	-	1/200	-	-
5	-	1/50	1/200	-	1/25
6	-	1/50	1/200	-	-
7	-	-	1/400	1/25	-
8	-	-	1/200	-	-
9	-	-	1/400	1/25	-
10	-	1/50	1/200	-	-
11	-	-	1/400	-	-
12	-	1/25	1/200	1/25	1/50
13	-	1/50	1/400	-	1/25
14	-	-	1/100	-	1/25
15	-	-	-	1/25	1/25
16	-	1/100	1/400	-	1/50

FIGURA 3 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PÓS-VACINAIS PARA *Leptospira interrogans* SOROVAR *copenhageni* aos 30 DIAS

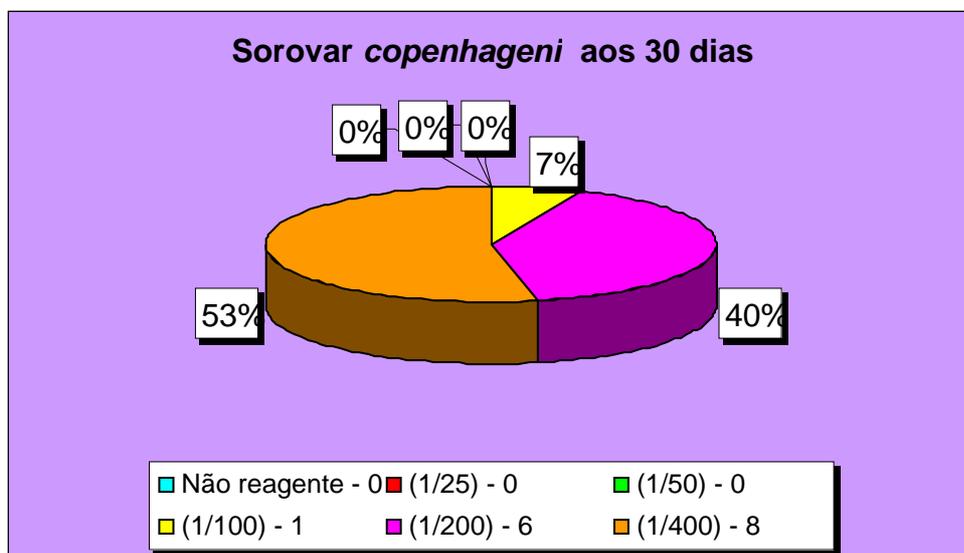


FIGURA 4 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PÓS-VACINAIS PARA *Leptospira interrogans* SOROVAR *canicola* AOS 30 DIAS

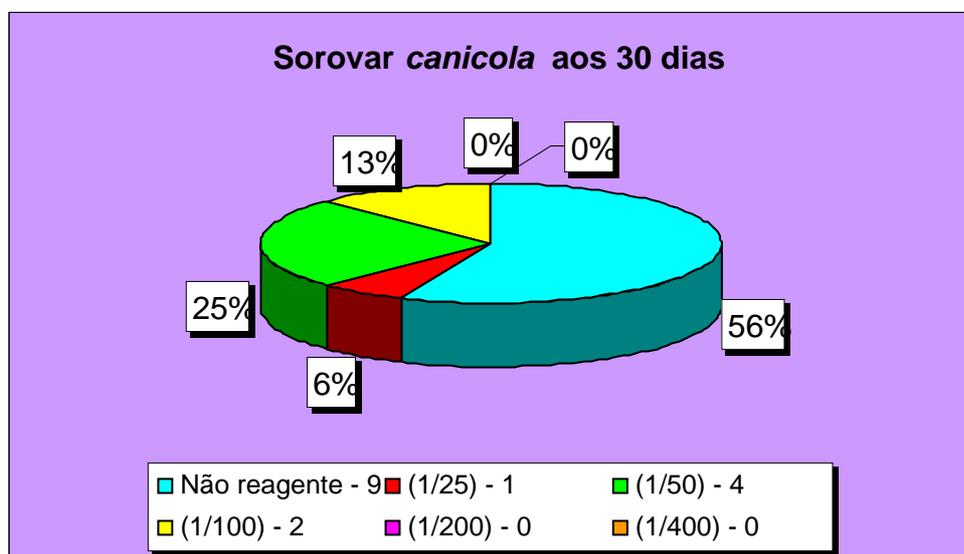


FIGURA 5 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PÓS-VACINAIS PARA *Leptospira interrogans* SOROVAR *grippotyphosa* AOS 30 DIAS

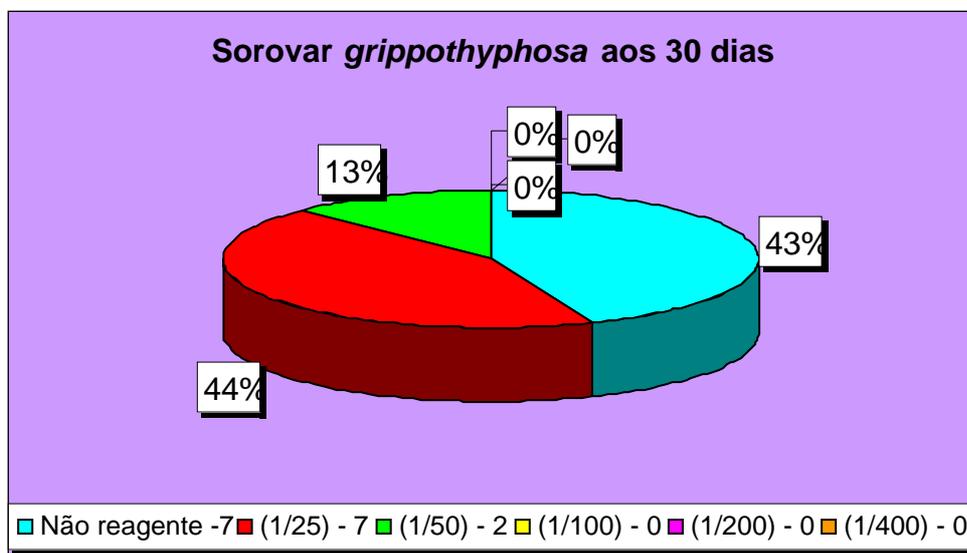


FIGURA 6 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PÓS-VACINAIS PARA *Leptospira interrogans* SOROVAR *pomona* AOS 30 DIAS

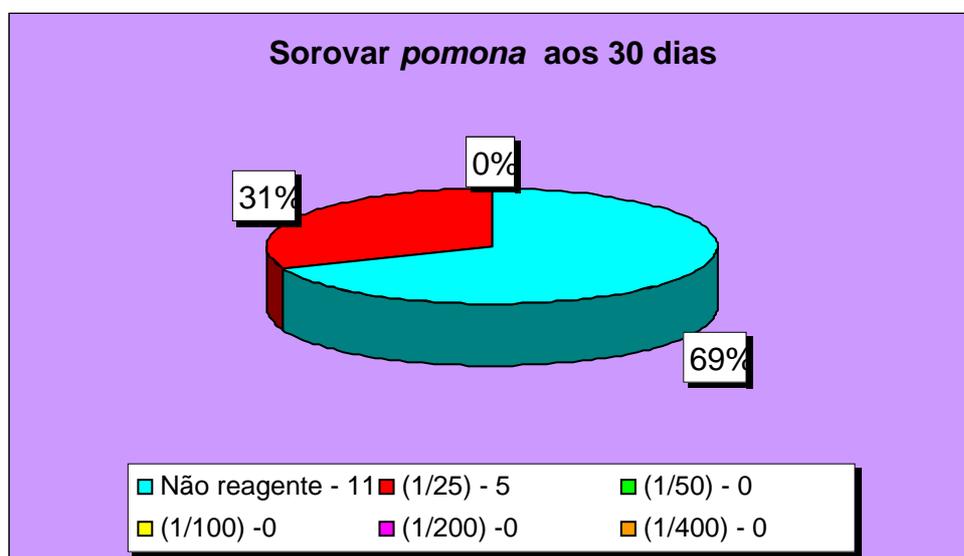
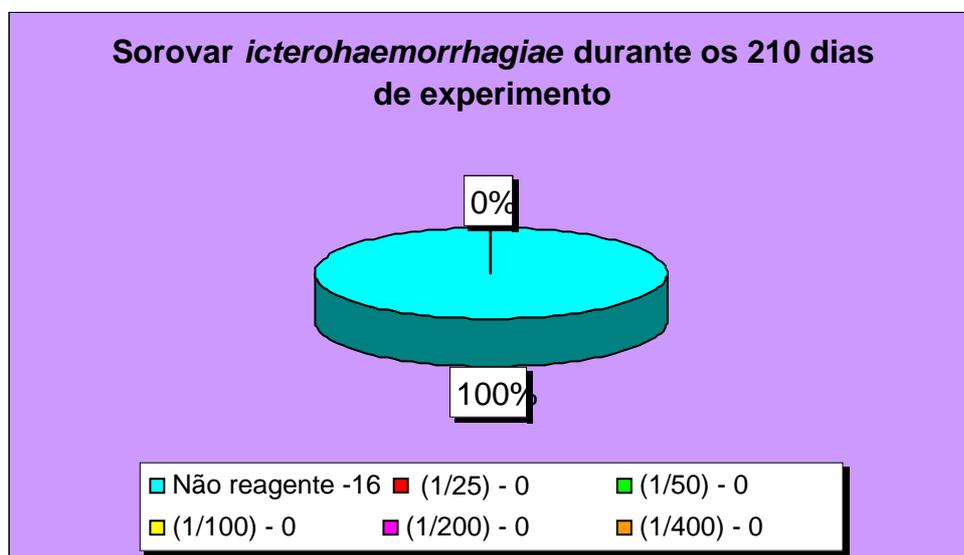


FIGURA 7 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PRÉ E PÓS-VACINAIS PARA *Leptospira interrogans* SOROVAR *icterohaemorrhagiae* DURANTE OS 210 DIAS DE EXPERIMENTO



#### 4.3 TÍTULOS PÓS-VACINAIS AOS 60 DIAS

Observou-se aos 60 dias uma queda dos títulos sorológicos, principalmente naqueles obtidos para o sorovar *copenhageni*. Quatro amostras que apresentavam títulos de 1/400 baixaram para 1/200 (amostras 01, 03, 07 e 16); três amostras com mesmo título de 1/400 baixaram para 1/100 (amostras 02, 09 e 11) e uma amostra de mesmo título (1/400) baixou para 1/50 (amostra 13). Cinco amostras com títulos de 1/200 baixaram para 1/100 (amostras 05, 06, 08, 10 e 12); uma amostra com título de 1/200 manteve o mesmo título (amostra 04). Somente duas amostras não reagiram: uma amostra já anteriormente não reagente (amostra 15) e outra que apresentou anteriormente título de 1/100 (amostra 14) (Tabela 3; Figura 8).

TABELA 3 – TÍTULOS SOROLÓGICOS AOS 60 DIAS PÓS-VACINAIS PARA *L. interrogans*, SOROVARES *icterohaemorrhagiae*, *canicola*, *copenhageni*, *pomona* e *grippotyphosa*, DOS 16 CÃES EXPERIMENTAIS

Animais	<i>L.icterohaemorrhagiae</i>	<i>L.canicola</i>	<i>L.copenhageni</i>	<i>L.pomona</i>	<i>L.grippotyphosa</i>
1	-	1/25	1/200	-	-
2	-	-	1/100	-	-
3	-	-	1/200	1/25	-
4	-	-	1/200	-	-
5	-	1/50	1/100	-	-
6	-	1/25	1/100	-	-
7	-	-	1/200	-	-
8	-	-	1/100	-	-
9	-	-	1/100	-	-
10	-	1/50	1/100	-	-
11	-	-	1/100	-	-
12	-	-	1/100	-	-
13	-	1/25	1/50	-	-
14	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-
16	-	1/50	1/200	-	-

FIGURA 8 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PÓS-VACINAIS PARA *Leptospira interrogans* SOROVAR *copenhageni* AOS 60 DIAS

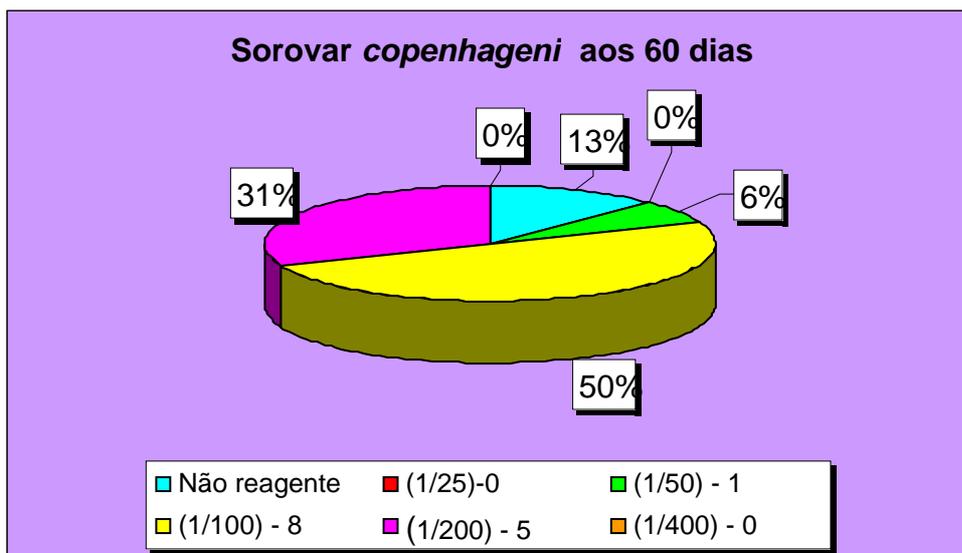


FIGURA 9 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PÓS-VACINAIS PARA *Leptospira interrogans* SOROVAR *canicola* AOS 60 DIAS

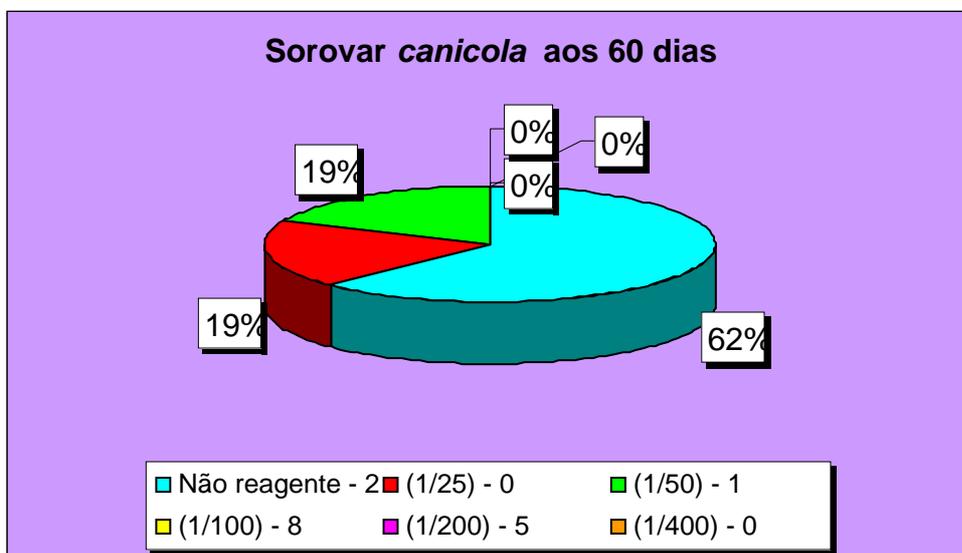


FIGURA 10 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PÓS-VACINAIS PARA *Leptospira interrogans* SOROVAR *grippotyphosa* AOS 60, 90, 120, 150, 180 E 210 DIAS

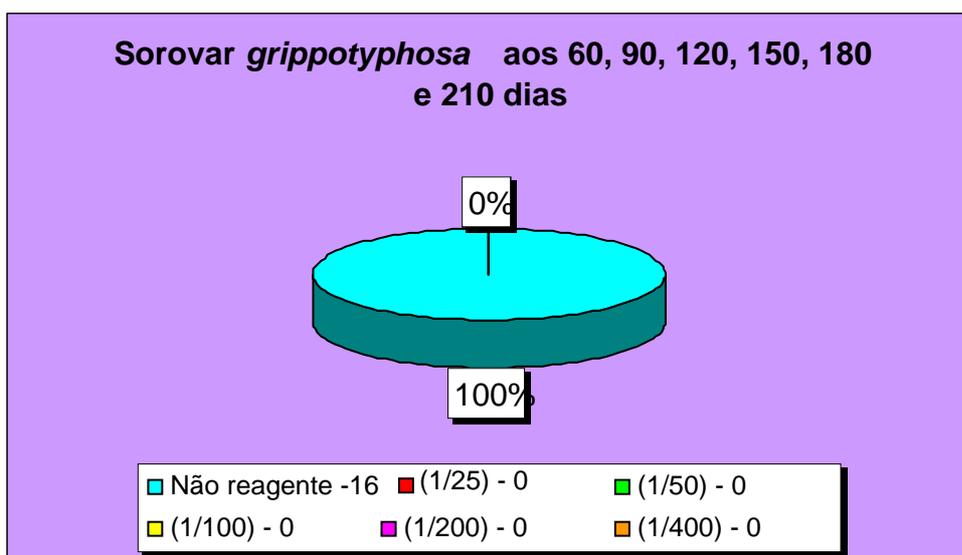
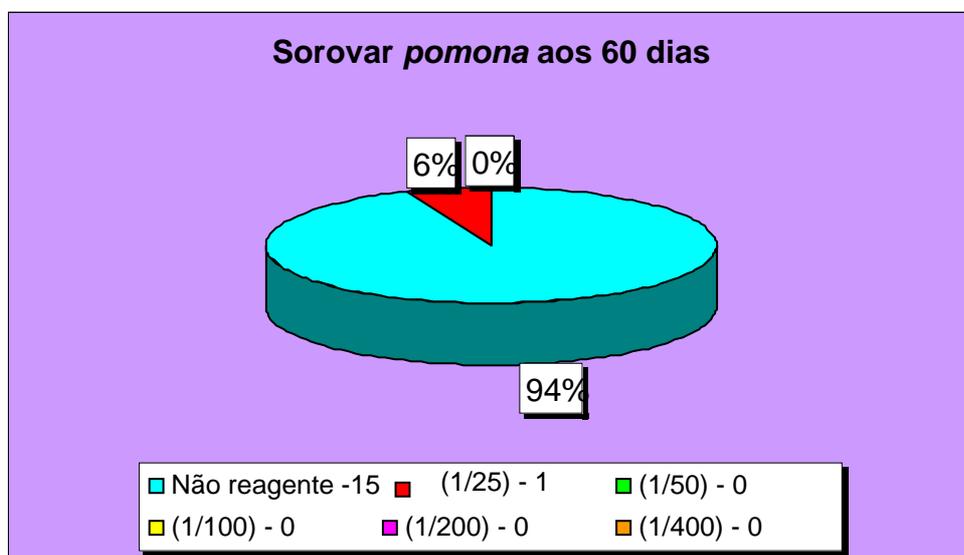


FIGURA 11 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PÓS-VACINAIS PARA *Leptospira interrogans* SOROVAR *pomona* AOS 60 DIAS



#### 4.4 TÍTULOS PÓS-VACINAIS AOS 90 DIAS

Aos 90 dias pós-vacinais, foram observadas reações aglutinantes somente para o sorovar *copenhageni* na titulação de 1/25 nas amostras 01, 04, 06 e 07 (Tabela 4; Figura 12).

Não foram observadas reações frente aos demais antígenos utilizados (Tabela 4; Figuras 13, 14, 15 e 16).

TABELA 4 – TÍTULOS SOROLÓGICOS AOS 90 DIAS PÓS-VACINAIS PARA *L. interrogans*, SOROVARES *icterohaemorrhagiae*, *canicola*, *copenhagani*, *pomona* e *grippotyphosa*, DOS 16 CÃES EXPERIMENTAIS

Animais	<i>L.icterohae morrhagiae</i>	<i>L.canicola</i>	<i>L.copenhagani</i>	<i>L.pomona</i>	<i>L.grippoty phosa</i>
1	-	-	1/25	-	-
2	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-
4	-	-	1/25	-	-
5	-	-	-	-	-
6	-	-	1/25	-	-
7	-	-	1/25	-	-
8	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-

FIGURA 12 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PÓS-VACINAIS PARA *Leptospira interrogans* SOROVAR *copenhagani* AOS 90 DIAS

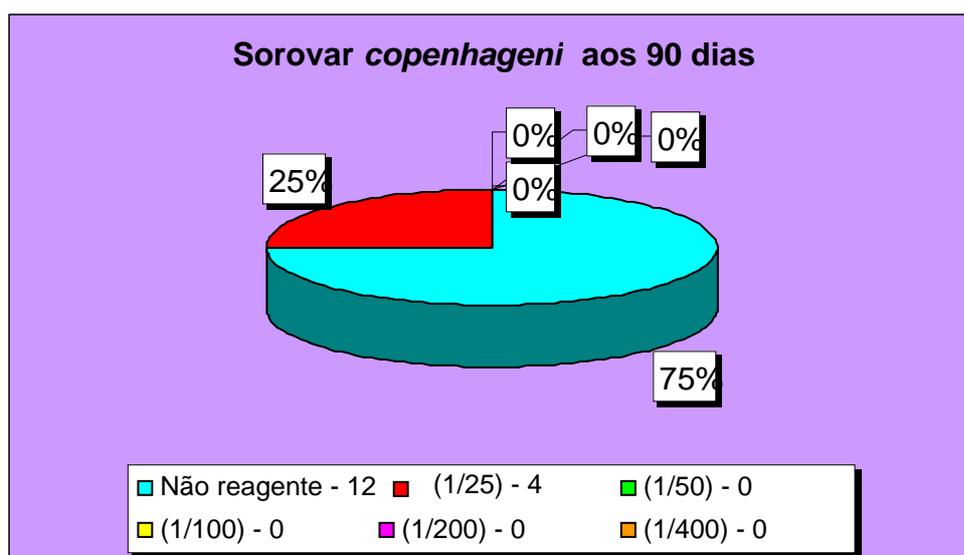


FIGURA 13 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PÓS-VACINAIS PARA *Leptospira interrogans* SOROVAR *canicola* AOS 90 DIAS

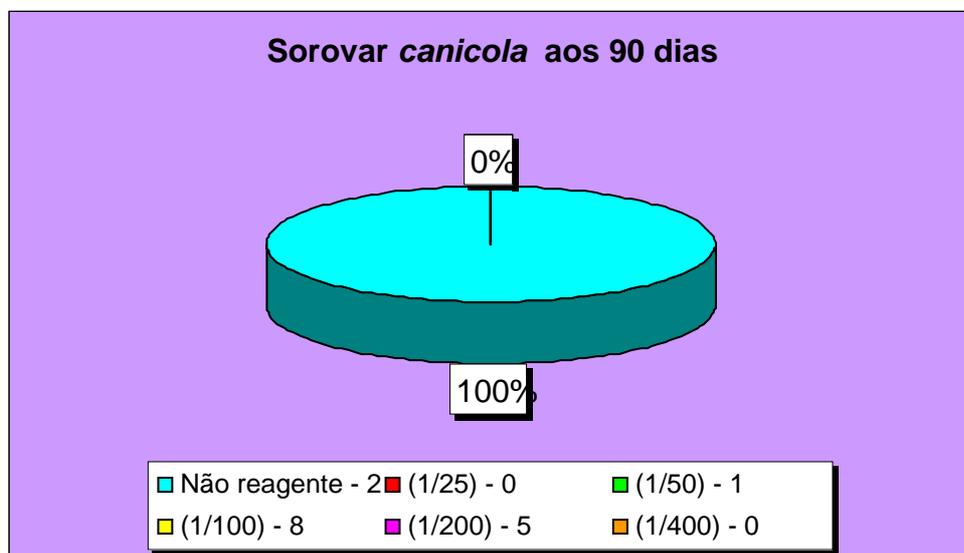
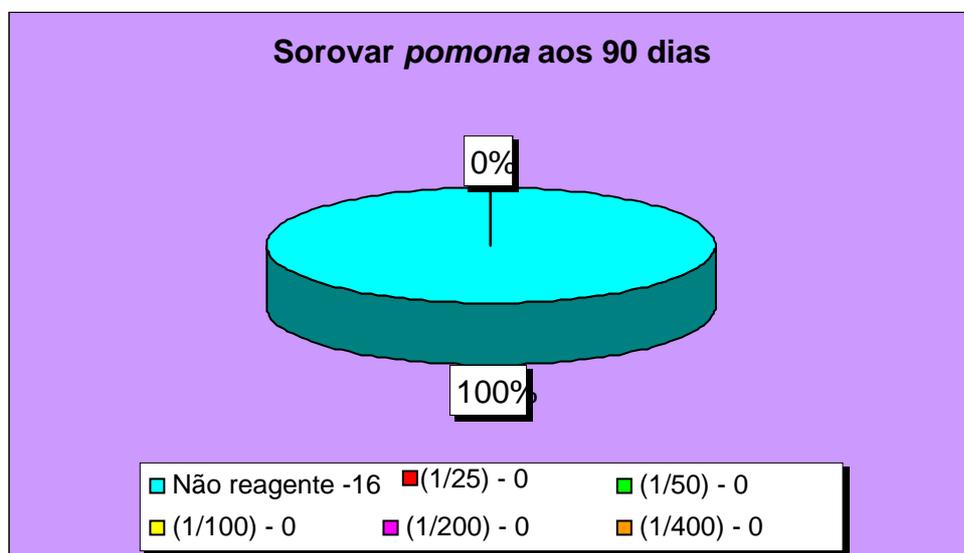


FIGURA 14 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PÓS-VACINAIS PARA *Leptospira interrogans* SOROVAR *pomona* AOS 90 DIAS



#### 4.5 TÍTULOS PÓS-VACINAIS AOS 120 DIAS

Aos 90 dias da vacinação, realizou-se uma revacinação (*booster*) com o objetivo de verificar as alterações nos títulos aglutinantes proporcionadas pelo reforço vacinal.

Das únicas quatro amostras que eram reagentes aos 90 dias para o sorovar *copenhageni*, com título de 1/25, três delas (amostras 01, 04 e 07) mantiveram os mesmos títulos e apenas uma (amostra 06), não se apresentou reagente.

As demais amostras não reagentes aos 90 dias (amostras 02, 03, 05, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16) aos 120 dias apresentaram reações aglutinantes com títulos que variaram de 1/25 (amostras 10 e 12) e 1/50 (amostras 03, 08, 09 e 16). As demais amostras (02, 05, 11, 13, 14 e 15) não apresentaram aglutinação.

Para o sorovar *canicola* houve titulação de 1/25 em duas amostras (amostras 09 e 15) e titulação de 1/50 nas amostras 06 e 16. Não houve reagentes para as demais amostras (Tabela 5; Figuras 15, 16, 17, 18 e 19).

O sorovar *pomona*, apesar da baixa titulação, teve o maior número de reagentes (94%), com títulos variando de 1/25 (amostras 06, 07 e 13) e 1/50 (amostras 01, 02, 03, 04, 05, 08, 09, 10, 11, 12, 14 e 15) e a amostra 16 como não reagente.

Frente aos sorovares *icterohaemorrhagiae* e *grippotyphosa* não foram observadas reações sorológicas aglutinantes (Figuras 7 e 10).

TABELA 5 – TÍTULOS SOROLÓGICOS AOS 120 DIAS PÓS-VACINAIS PARA *L. interrogans*, SOROVARES *icterohaemorrhagiae*, *cani-cola*, *copenhageni*, *pomona* e *grippotyphosa*, DOS 16 CÃES EXPERIMENTAIS

Animais	<i>L.icterohaemorrhagiae</i>	<i>L.canicola</i>	<i>L.copenhageni</i>	<i>L.pomona</i>	<i>L.grippotyphosa</i>
1	-	-	1/25	1/50	-
2	-	-	-	1/50	-
3	-	-	1/50	1/50	-
4	-	-	1/25	1/50	-
5	-	-	-	1/50	-
6	-	1/50	-	1/25	-
7	-	-	1/25	1/25	-
8	-	-	1/50	1/50	-
9	-	1/25	1/50	1/50	-
10	-	-	1/25	1/50	-
11	-	-	-	1/50	-
12	-	-	1/25	1/50	-
13	-	-	-	1/25	-
14	-	-	-	1/50	-
15	-	1/25	-	1/50	-
16	-	1/50	1/50	-	-

FIGURA 15 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PÓS-VACINAIS PARA *Leptospira interrogans* SOROVAR *copenhageni* AOS 120 DIAS

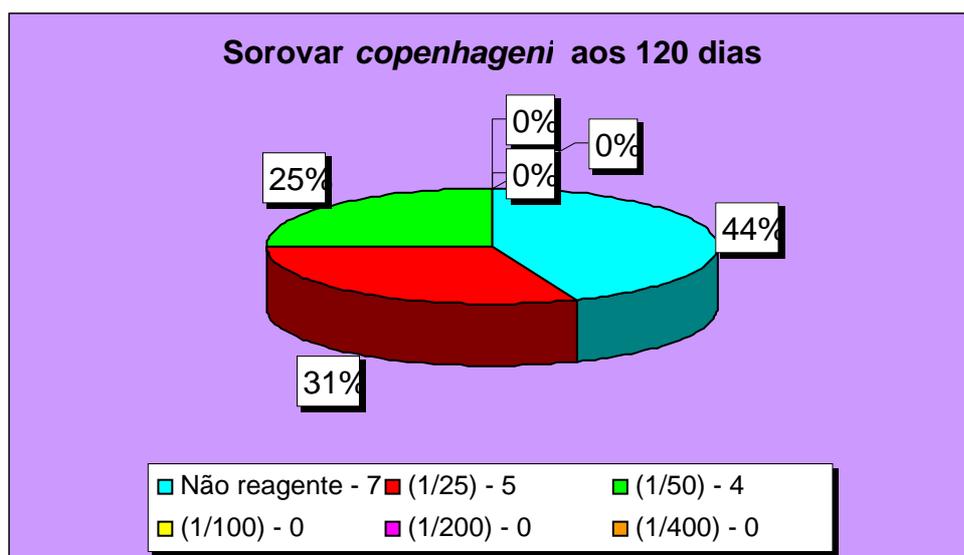


FIGURA 16 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PÓS-VACINAIS PARA *Leptospira interrogans* SOROVAR *canicola* AOS 120 DIAS

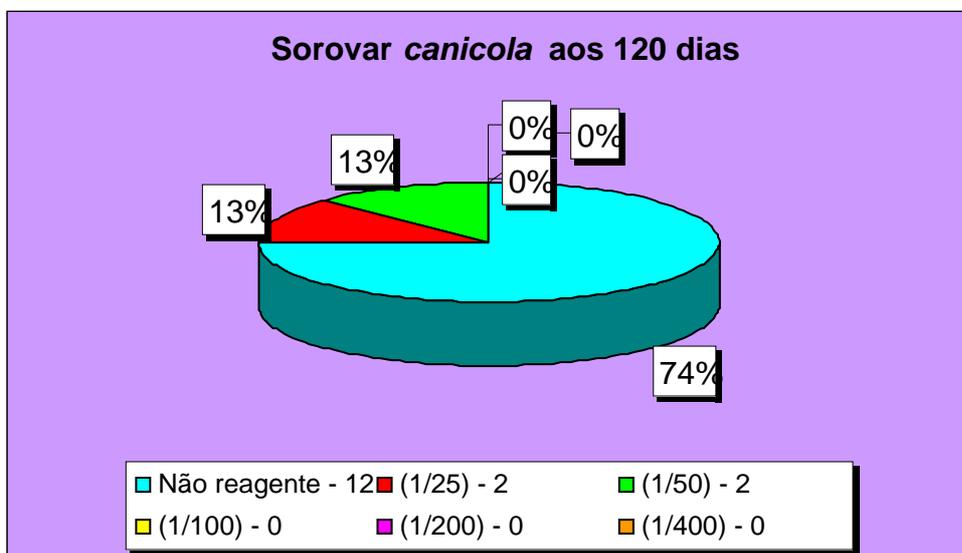
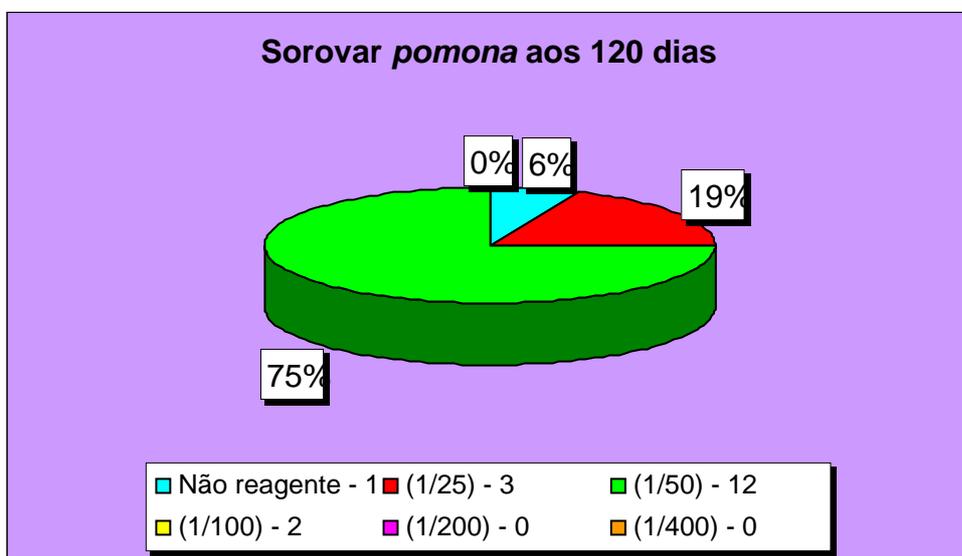


FIGURA 17 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PÓS-VACINAIS PARA *Leptospira interrogans* SOROVAR *pomona* AOS 120 DIAS



#### 4.6 TÍTULOS PÓS-VACINAIS AOS 150 DIAS

Aos 150 dias os títulos sorológicos para o sorovar *copenhageni* aumentaram para 1/100 (amostras 08, 09, 10 e 16) e 1/200 na amostra 03. As amostras 02, 04, 05, 06, 07, 11, 14 e 15 não reagiram. As amostras 01 e 12 e a amostra 13 mantiveram-se com os títulos 1/50 e 1/25 respectivamente (Tabela 6; Figura 18)

Para o sorovar *canicola* observou-se apenas uma amostra reagente (06) (1/25) (Figura 19).

Para o sorovar *pomona* os títulos se mantiveram em 1/50 em quatro amostras (amostras 02, 03, 09 e 15), 1/25 em cinco amostras (amostras 01, 08, 10, 13 e 16) e não reagentes em sete amostras (amostras 04, 05, 06, 07, 11, 12 e 14). (Figura 20)

Frente aos sorovares *icterohaemorrhagiae* e *grippotyphosa* não se obteve reação aglutinante (Figuras 7 e 10).

TABELA 6 – TÍTULOS SOROLÓGICOS AOS 150 DIAS PÓS-VACINAIS PARA *L. interrogans*, SOROVARES *icterohaemorrhagiae*, *canicola*, *copenhageni*, *pomona* e *grippotyphosa*, DOS 16 CÃES EXPERIMENTAIS

Animais	<i>L.icterohaemorrhagiae</i>	<i>L.canicola</i>	<i>L.copenhageni</i>	<i>L.pomona</i>	<i>L.grippotyphosa</i>
1	-	-	1/50	1/25	-
2	-	-	-	1/50	-
3	-	-	1/200	1/50	-
4	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-
6	-	1/25	-	-	-
7	-	-	-	-	-
8	-	-	1/100	1/25	-
9	-	-	1/100	1/50	-
10	-	-	1/100	1/25	-
11	-	-	-	-	-
12	-	-	1/50	-	-
13	-	-	1/25	1/25	-
14	-	-	-	-	-
15	-	-	-	1/50	-
16	-	-	1/100	1/25	-

FIGURA 18 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PÓS-VACINAIS PARA *Leptospira interrogans* SOROVAR *copenhageni* AOS 150 DIAS

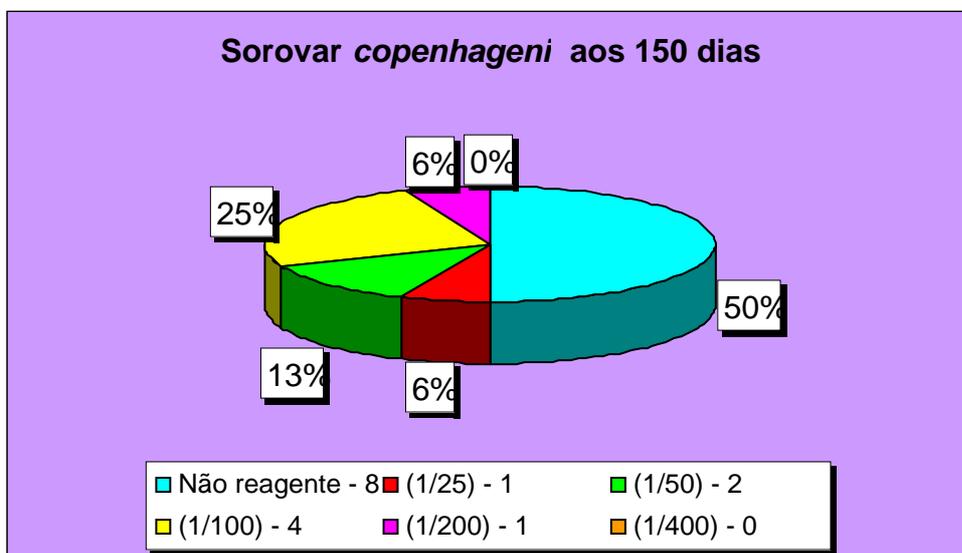


FIGURA 19 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PÓS-VACINAIS PARA *Leptospira interrogans* SOROVAR *canicola* AOS 150 DIAS

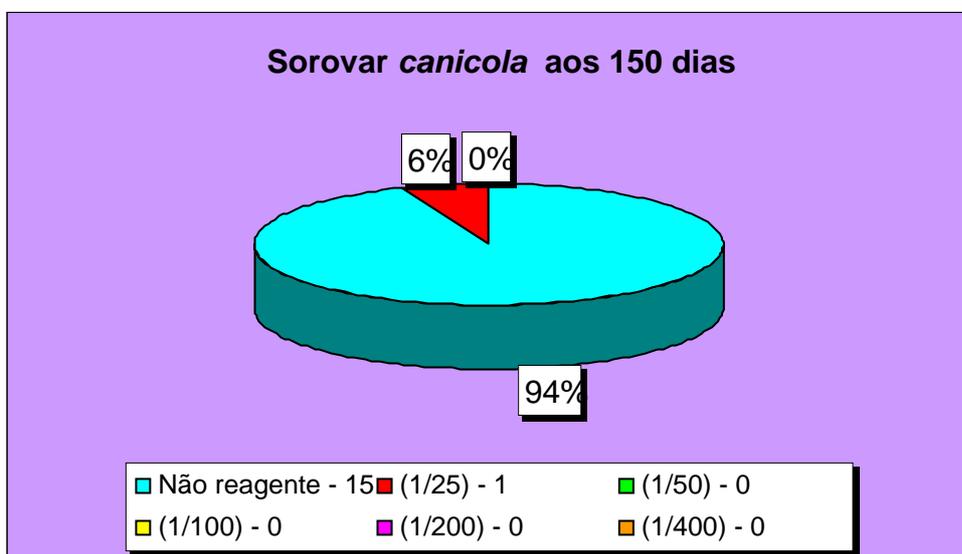
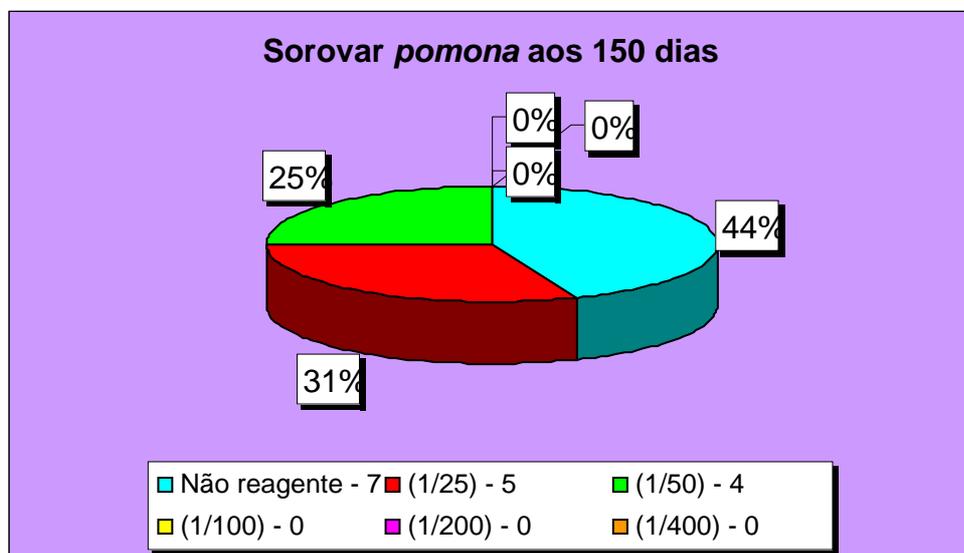


FIGURA 20 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PÓS-VACINAIS PARA *Leptospira interrogans* SOROVAR *pomona* AOS 150 DIAS



#### 4.7 TÍTULOS PÓS-VACINAIS AOS 180 DIAS

Frente ao sorovar *copenhageni*, aos 180 dias, as amostras 03, 04, 05, 06, 08, 09, 10, 14, 15 e 16 foram não reagentes. As amostras 12 e a 13 apresentaram títulos de 1/25. A amostra 07 apresentou título de 1/50. As amostras 01 e 11 apresentaram titulação de 1/100 e a amostra 02, título de 1/200 (Figura 21).

Aos 180 dias não se obteve alteração de título para o sorovar *canicola* nas amostras 01, 02, 04, 07, 08, 11, 12, 14 e 15. As amostras 06, 09 e 10 apresentaram titulação de 1/25 e as amostras 03, 05, 13 e 16 a titulação de 1/50 (Tabela 7; Figura 22).

Observou-se reação aglutinante para o sorovar *pomona* com os seguintes resultados: não-reagentes (amostras: 04, 05, 06, 08, 10, 13 e 14), 1/25 (amostras: 01, 07, 11, 12, 15 e 16) e 1/50 (amostras: 02, 03 e 09) (Figura 23).

Frente aos sorovares *icterohaemorrhagiae* e *grippotyphosa* não se obtiveram amostras reagentes (Figuras 7 e 10).

TABELA 7 – TÍTULOS SOROLÓGICOS AOS 180 DIAS PÓS-VACINAIS PARA *L. interrogans*, SOROVARES *icterohaemorrhagiae*, *canicola*, *copenhageni*, *pomona* e *grippotyphosa*, DOS 16 CÃES EXPERIMENTAIS

Animais	<i>L.icterohae morrhagiae</i>	<i>L.canicola</i>	<i>L.copenhageni</i>	<i>L.pomona</i>	<i>L.grippoty phosa</i>
1	-	-	1/100	1/25	-
2	-	-	1/200	1/50	-
3	-	1/50	-	1/50	-
4	-	-	-	-	-
5	-	1/50	-	-	-
6	-	1/25	-	-	-
7	-	-	1/50	1/25	-
8	-	-	-	-	-
9	-	1/25	-	1/50	-
10	-	1/25	-	-	-
11	-	-	1/100	1/25	-
12	-	-	1/25	1/25	-
13	-	1/50	1/25	-	-
14	-	-	-	-	-
15	-	-	-	1/25	-
16	-	1/50	-	1/25	-

FIGURA 21 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PÓS-VACINAIS PARA *Leptospira interrogans* SOROVAR *copenhageni* AOS 180 DIAS

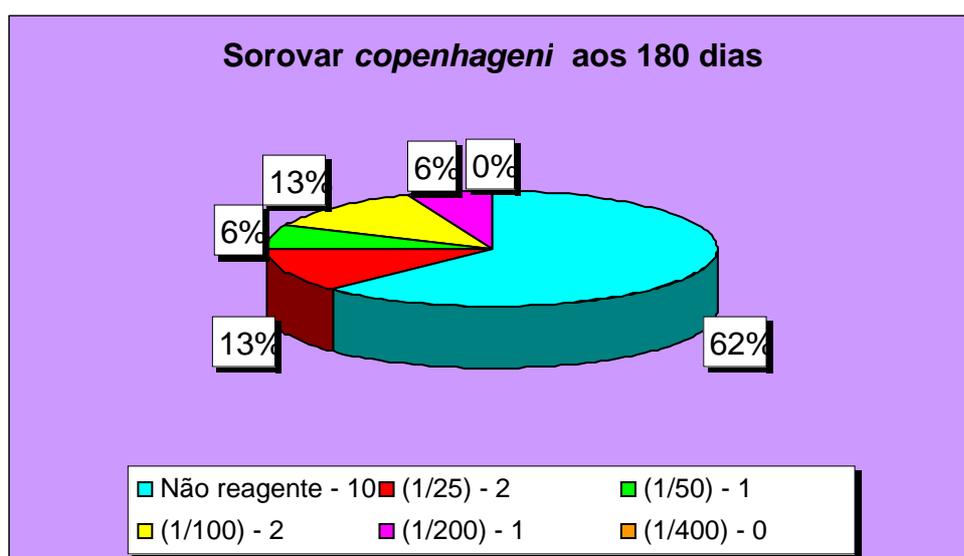


FIGURA 22 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PÓS-VACINAIS PARA *Leptospira interrogans* SOROVAR *canicola* AOS 180 DIAS

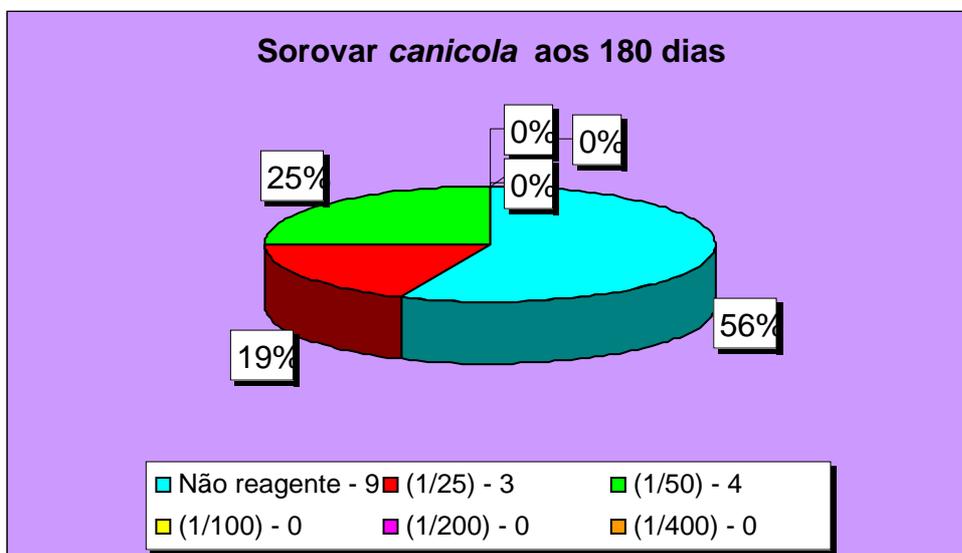
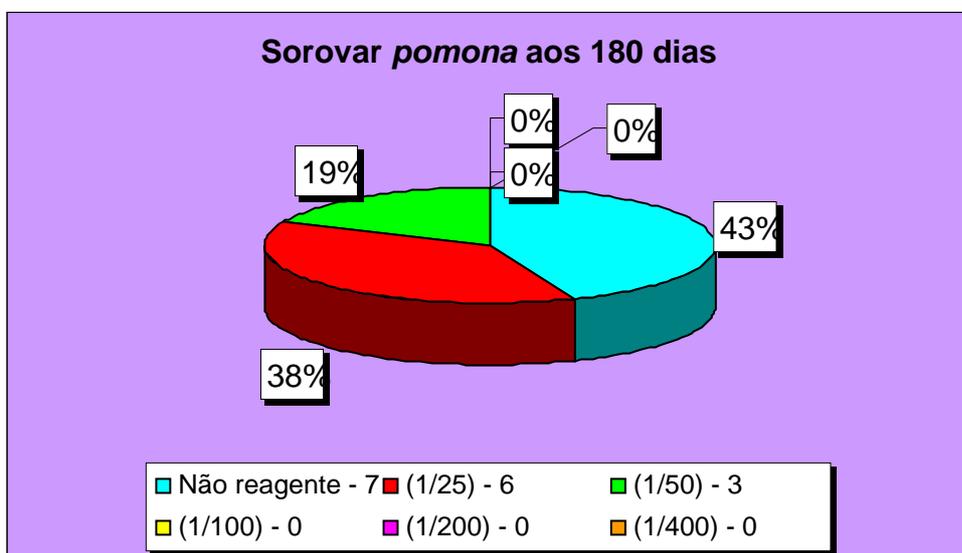


FIGURA 23 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PÓS-VACINAIS PARA *Leptospira interrogans* SOROVAR *pomona* AOS 180 DIAS



#### 4.8 TÍTULOS PÓS-VACINAIS AOS 210 DIAS

Frente ao sorovar *copenhageni* a amostra 13 apresentou titulação de 1/25. Apresentaram titulação de 1/50 as amostras 02, 03, 12, 14 e 16. As amostras 01, 07, 09, 10 e 11 apresentaram titulação de 1/100. As amostras 04, 05, 06, 08 e 15 foram não-reagentes (Figura 24).

Frente ao sorovar *canicola* somente as amostras 05, 06 e 13 reagiram com títulos aglutinantes de 1/25. As demais amostras foram não-reagentes (Tabela 8; Figura 25).

Aos 210 dias não foram observadas reações sorológicas detectáveis para os sorovares restantes (Figuras 7, 10 e 26).

TABELA 8 – TÍTULOS SOROLÓGICOS AOS 210 DIAS PÓS-VACINAIS PARA *L. interrogans*, SOROVARES *icterohaemorrhagiae*, *canicola*, *copenhageni*, *pomona* e *grippotyphosa*, DOS 16 CÃES EXPERIMENTAIS

Animais	<i>L.icterohae morrhagiae</i>	<i>L.canicola</i>	<i>L.copenhageni</i>	<i>L.pomona</i>	<i>L.grippoty phosa</i>
1	-	-	1/100	-	-
2	-	-	1/50	-	-
3	-	-	1/50	-	-
4	-	-	-	-	-
5	-	1/25	-	-	-
6	-	1/25	-	-	-
7	-	-	1/100	-	-
8	-	-	-	-	-
9	-	-	1/100	-	-
10	-	-	1/100	-	-
11	-	-	1/100	-	-
12	-	-	1/50	-	-
13	-	1/25	1/25	-	-
14	-	-	1/50	-	-
15	-	-	-	-	-
16	-	1/25	1/50	-	-

FIGURA 24 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PÓS-VACINAIS PARA *Leptospira interrogans* SOROVAR *copenhageni* AOS 210 DIAS

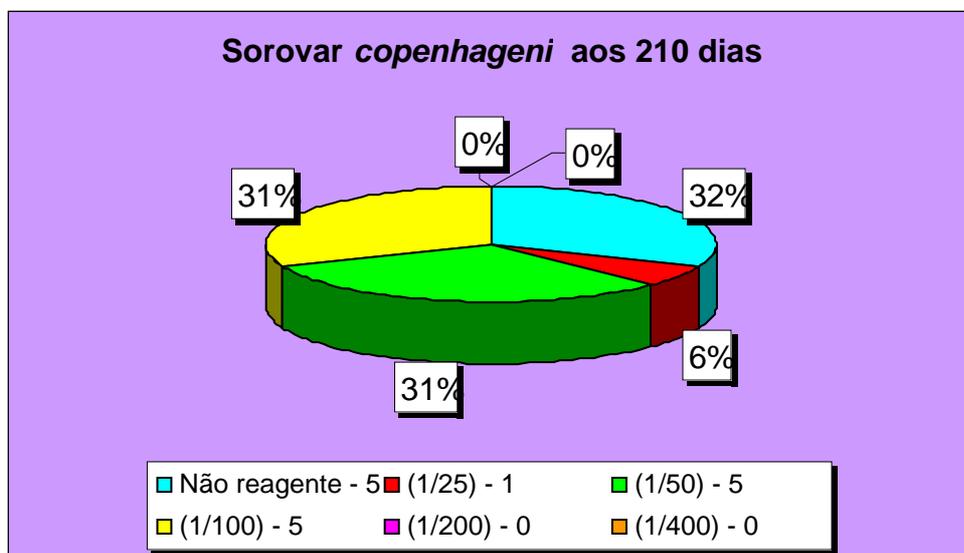


FIGURA 25 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PÓS-VACINAIS PARA *Leptospira interrogans* SOROVAR *canicola* AOS 210 DIAS

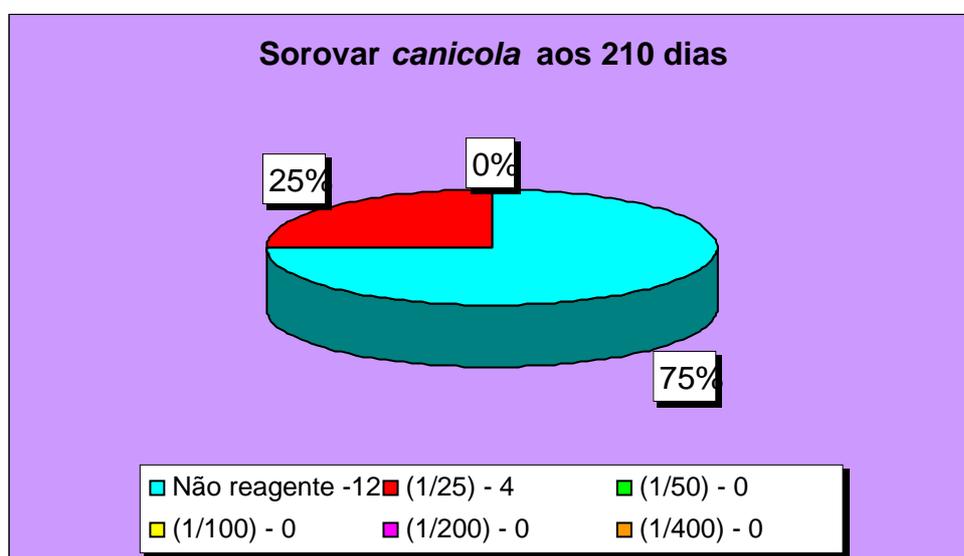


FIGURA 26 - TÍTULOS SOROLÓGICOS PÓS-VACINAIS PARA *Leptospira interrogans* SOROVAR *pomona* AOS 210 DIAS

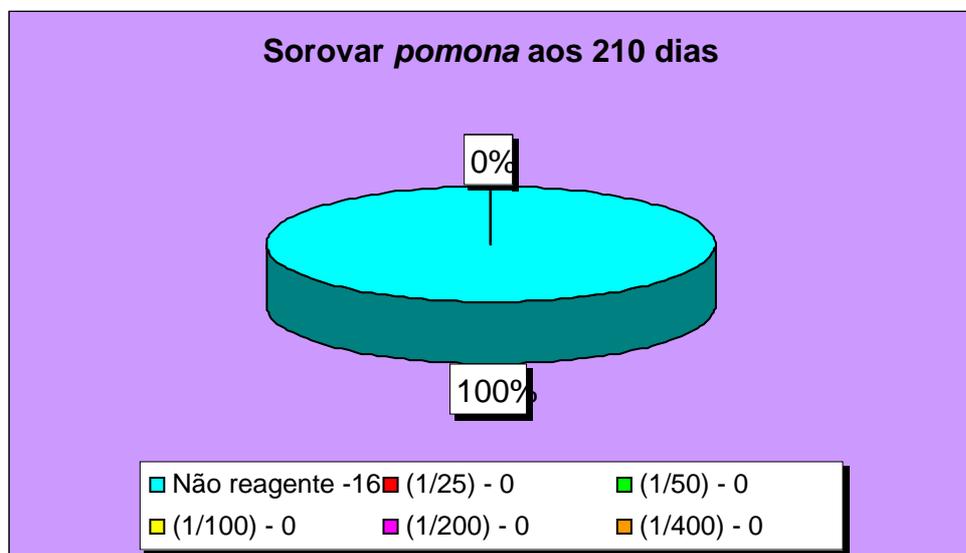


FIGURA 27 - GRÁFICO COMPARATIVO ENTRE OS TÍTULOS AGLUTINANTES DOS TRÊS PRINCIPAIS SOROVARES DURANTE OS 210 DIAS DE EXPERIMENTO – ANIMAL 01

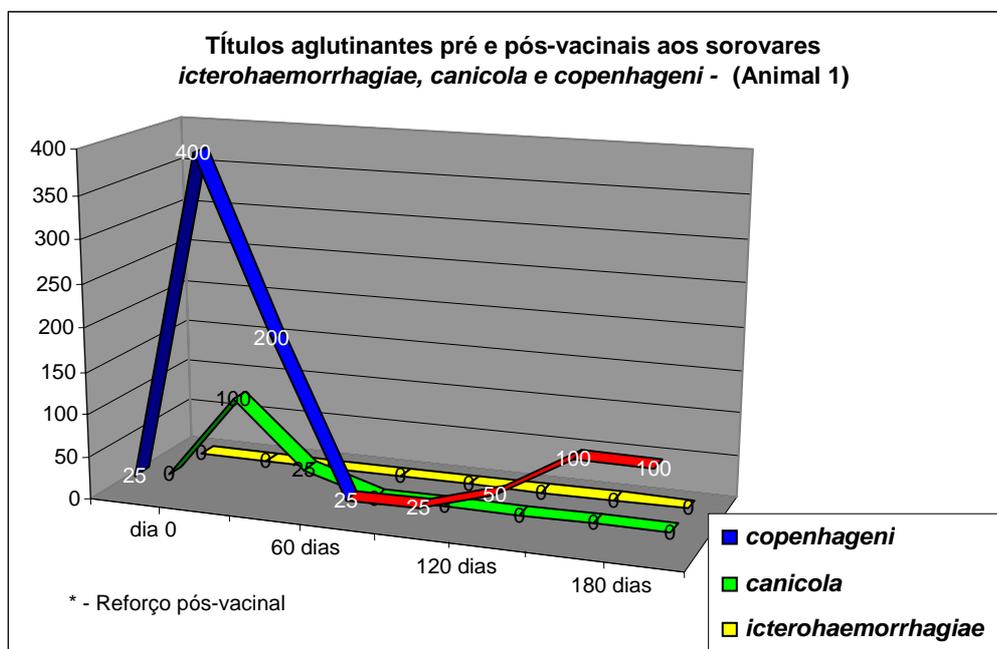


FIGURA 28 - GRÁFICO COMPARATIVO ENTRE OS TÍTULOS AGLUTINANTES DOS TRÊS PRINCIPAIS SOROVARES DURANTE OS 210 DIAS DE EXPERIMENTO – ANIMAL 03

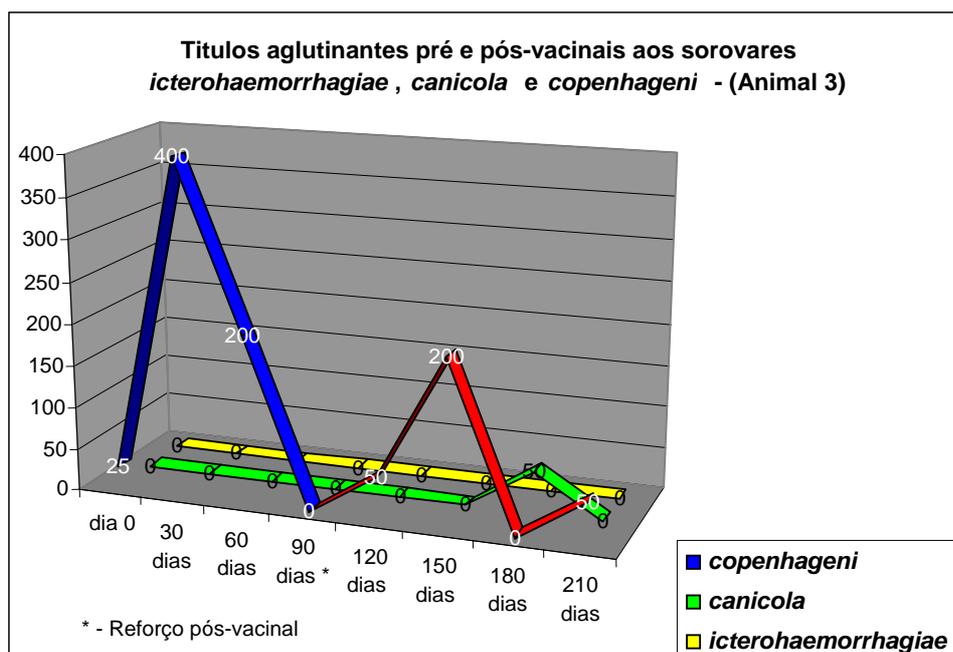


FIGURA 29 - GRÁFICO COMPARATIVO ENTRE OS TÍTULOS AGLUTINANTES DOS TRÊS PRINCIPAIS SOROVARES DURANTE OS 210 DIAS DE EXPERIMENTO – ANIMAL 05

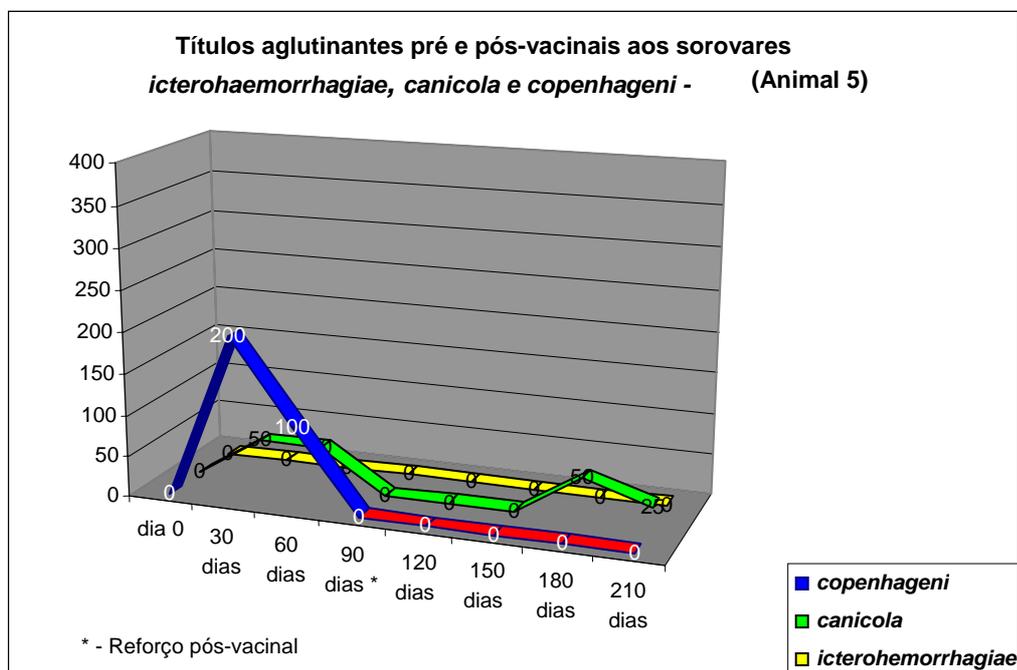


FIGURA 30 - GRÁFICO COMPARATIVO ENTRE OS TÍTULOS AGLUTINANTES DOS TRÊS PRINCIPAIS SOROVARES DURANTE OS 210 DIAS DE EXPERIMENTO – ANIMAL 07

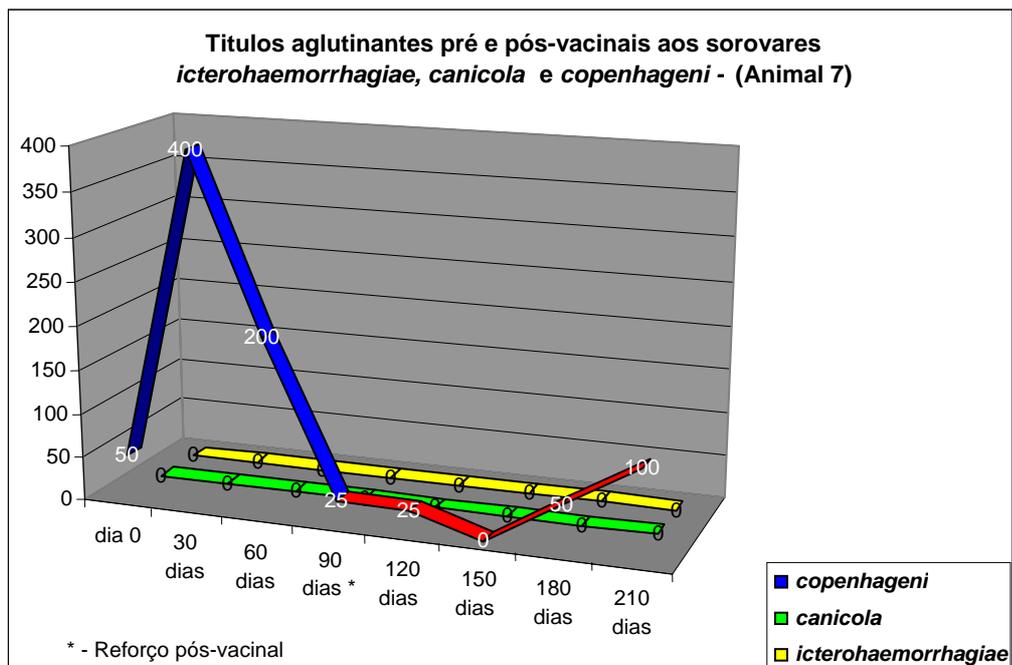


FIGURA 31 - GRÁFICO COMPARATIVO ENTRE OS TÍTULOS AGLUTINANTES DOS TRÊS PRINCIPAIS SOROVARES DURANTE OS 210 DIAS DE EXPERIMENTO – ANIMAL 09

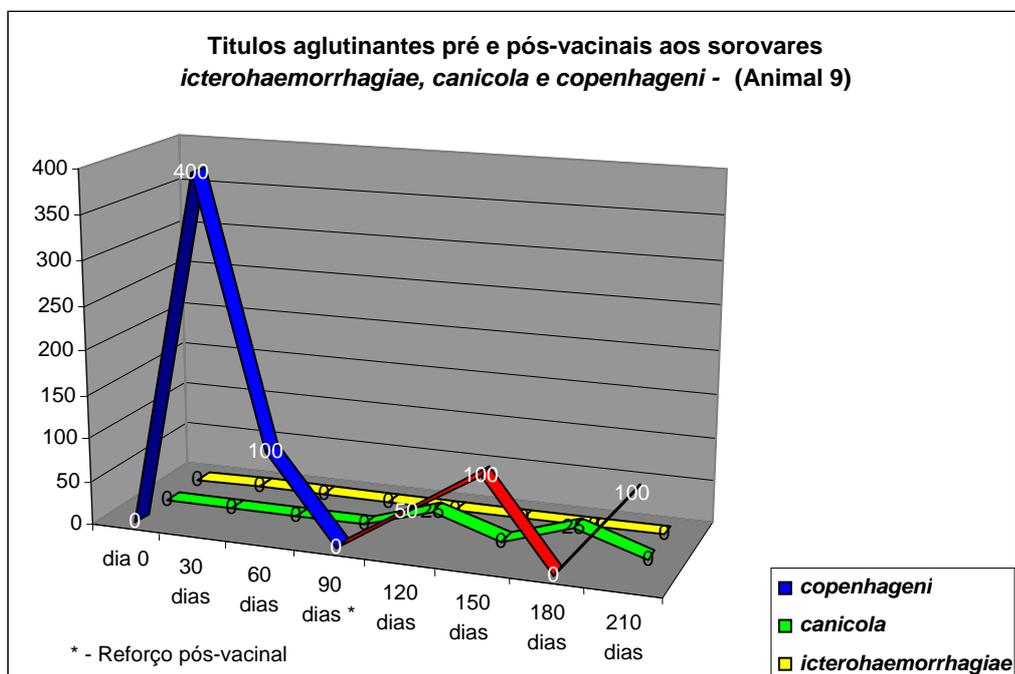
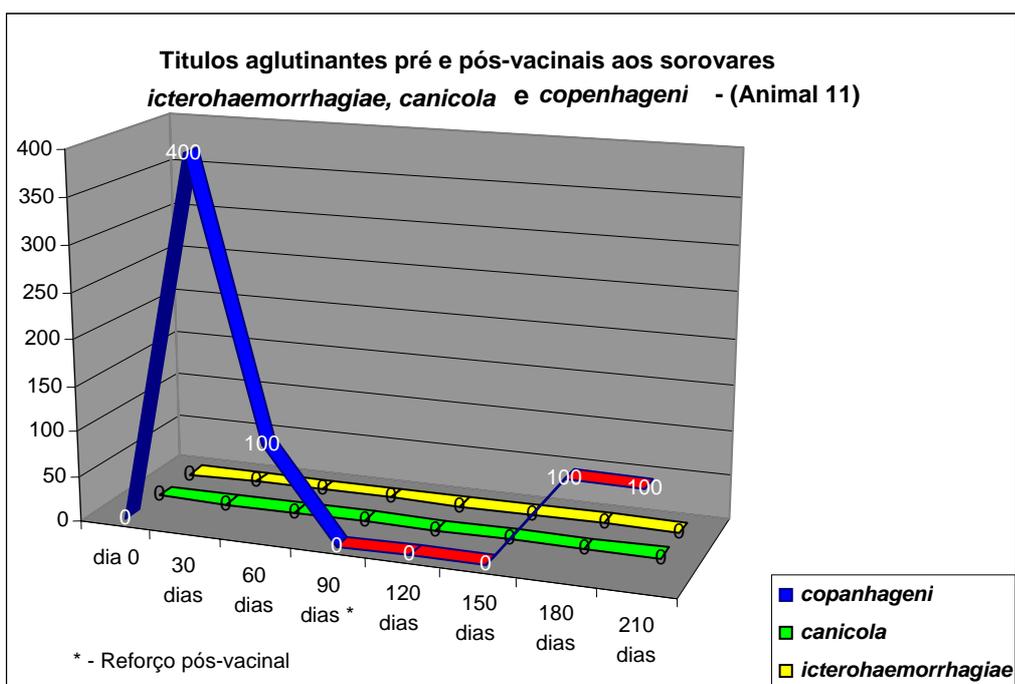


FIGURA 32 - GRÁFICO COMPARATIVO ENTRE OS TÍTULOS AGLUTINANTES DOS TRÊS PRINCIPAIS SOROVARES DURANTE OS 210 DIAS DE EXPERIMENTO – ANIMAL 11



## 5 DISCUSSÃO

Conforme pôde ser observado na Tabela 1, das 16 amostras colhidas no presente estudo, 12 delas (75%) apresentaram reações sorológicas pré-vacinais com títulos que variaram de 1/25 (57%), 1/50 (12%) e 1/100 (6%), frente ao sorovar *copenhageni*, tendo sido o único sorovar para o qual os soros mostraram reação de microaglutinação. Dados referentes aos protocolos vacinais a que foram submetidos estes animais, mostraram que, a última vacinação contra a leptospirose, havia ocorrido 12 meses antes da colheita destas amostras. A vacina utilizada nesta ocasião não continha o sorovar em questão. A indagação sobre este resultado levanta a seguinte hipótese: estes animais sofreram infecção sub-clínica prévia pelo sorovar identificado, já que, não há relato dos mesmos terem sofrido qualquer tipo de enfermidade infecciosa.

A presença do sorovar *copenhageni* na região de Curitiba, já havia sido relatada por MASUDA *et al.* (2003), cujo inquérito sorológico retrospectivo abrangendo os anos de 2001 a 2003, demonstrou a prevalência do mesmo sobre os sorovares, até então mais prevalentes, como o *icterohaemorrhagiae* e o *canicola*. Estes pesquisadores concluíram que, apesar das vacinas disponíveis no momento apresentarem vários sorovares da *Leptospira interrogans* em sua formulação, ainda não incluem nelas este sorovar identificado como de alta incidência, o *copenhageni*. Concluíram ainda que, essa alteração na dinâmica dos sorovares mais prevalentes, pode ser reflexo da ação seletora das vacinas nos cães, aliada ao grande crescimento populacional, acompanhada pela proliferação da fauna murina sinantrópica. Esta hipótese se fragiliza quando se sabe que, o mesmo sorovar apresenta, igualmente, alta prevalência entre as pessoas da mesma região de acordo com os dados da Secretaria da Saúde (SESA, 2002), não tendo, obrigatoriamente, a participação do cão na cadeia epidemiológica. Caso as pessoas se infectassem somente através dos cães, esta possibilidade se reforçaria, porém, sabe-se que a grande maioria das infecções humanas é em razão das contaminações do homem através de excreções murinas no meio ambiente (ACHA; SZYFRES, 2001).

Este mesmo sorovar foi o mais freqüentemente implicado no estado de São Paulo, onde, das 18 amostras de *Leptospira interrogans* isoladas de seres humanos,

14 (78%) foram classificadas como *copenhageni*, 2 (12%) como *canicola*, 1 (5%) como *pomona* e 1 (5%) como *castellonis* (SAKATA *et al.*, 1992). Dados semelhantes foram verificados por FAVERO *et al.* (2002) confirmando aumento do sorovar *copenhageni* em pesquisa realizada em cães nos estados de São Paulo, Piauí, Paraná e Rio Grande do Sul, durante os anos de 1984 e 1997, onde encontraram 24% das amostras sorológicas reagentes frente ao sorovar *copenhageni* enquanto que, 10,9% ao sorovar *icterohaemorrhagiae*.

Portanto, não resta dúvida, de que o sorovar *copenhageni* está presente infectando tanto populações humanas quanto caninas. Também fica evidente a perda do *status* do sorovar *icterohaemorrhagiae* a partir do ano de 2001, como o mais comumente encontrado causando infecções na região em estudo (MASUDA *et al.*, 2003). A preocupação da inclusão deste sorovar nas vacinas caninas parece ser uma necessidade premente, tendo em vista as especificidades antigênicas peculiares que cada sorovar apresenta. O que causou, inicialmente, maior perplexidade no presente estudo, foi constatar que, um mês após a primeira vacinação, os títulos aglutinantes para o sorovar *copenhageni* apresentaram uma vertiginosa alta, alternando-se em patamares de 1/25 e 1/50 para 1/200 e 1/400. Embora os títulos iniciais, anteriores a vacinação, tenham sido considerados baixos, não sendo interpretados como “infecção”, a constatação pós-vacinal desta súbita alteração para títulos considerados como, indicativos de infecção prévia pelo sorovar *copenhageni*, reforça a idéia de que este sorovar é, atualmente, aquele que se encontra mais presentemente causando infecções clínicas ou sub-clínicas na região. O que mais chama a atenção na Tabela 2 é a total ausência de reações aglutinantes frente ao sorovar *icterohaemorrhagiae*, mesmo este estando incluído como antígeno vacinal, não acontecendo o mesmo frente aos sorovares *canicola*, *pomona* e *grippotyphosa*, também incluídos na vacina, cujas reações de aglutinação variaram de 1/25 a 1/100.

Segundo ANDRÉ-FONTAINE e GANIÈRE, (19\_?) o sorovar *copenhageni* pertence ao sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* e devido a isto, compartilham antígenos somáticos comuns. ARIMITSU *et al.* (1980) verificaram que falta uma parte de componentes antigênicos presentes em *copenhageni*, ausentes no sorovar *icterohaemorrhagiae*, mas constataram que o anti-soro contra *icterohaemorrhagiae* demonstrou atividade leptospiricida potente contra a amostra de *copenhageni*.

De acordo com o Ministério da Saúde (FUNASA, 2001) o fenômeno da coaglutinação entre sorovares é de ocorrência comum dentro de um mesmo sorogrupo. Técnicas avançadas demonstraram que as espiroquetas só podem ser verdadeiramente classificadas taxonomicamente através de técnicas genéticas acuradas como a de Hibridização de DNA, de modo que, diagnósticos e classificações taxonômicas baseados apenas em métodos sorológicos e antigênicos, como a que utiliza a Microaglutinação Microscópica, podem não ser confiáveis o suficiente para distinguir sorovares tão semelhantes como sorovares *icterohaemorrhagiae* e *copenhageni* (BAROCCHI *et al.*, 2001; FUNASA, 2001). BAROCCHI *et al.* (2001), utilizando a técnica do PCR, identificaram uma seqüência repetitiva de DNA no sorovar *copenhageni* isolada de casos humanos, porém o sorovar *icterohaemorrhagiae*, amostra RGA e o sorovar *copenhageni*, amostra *Winjberg*, apresentaram padrões idênticos, concluindo não ser possível distingui-los através desta técnica. Qual seria então a explicação mais provável para a súbita alteração de títulos verificada na Tabela 2?

Devido às similaridades antigênicas entre os sorovares *copenhageni* e *icterohaemorrhagiae*, o que foi observado no pós-vacinal, foi uma reativação da resposta imune direcionada para o sorovar *copenhageni* e não para o sorovar *icterohaemorrhagiae*, corroborando com ARIMITSU *et al.* (1980), de que, determinados componentes antigênicos presentes no sorovar *copenhageni* não são encontrados no sorovar *icterohaemorrhagiae*, no entanto, os antígenos comuns entre estes dois sorovares e presentes no antígeno vacinal composto pelo sorovar *icterohaemorrhagiae* foram suficientes para a reativação do clone pré-existente induzido pela infecção pré-vacinal provocada pelo sorovar *copenhageni*.

O contato prévio com o sorovar *copenhageni*, provavelmente de origem infecciosa, demonstrado nos títulos pré-vacinais observados no dia 0, promoveu a formação de um clone de memória para proteínas de parede 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 ambas as cepas, tendo o clone de memória maior afeição às proteínas antigênicas da cepa que provocou infecção e não àquelas

que compõem a cepa vacinal inativada. Constatações semelhantes foram observadas por GITTON *et al.*, (1994), cujo experimento demonstrou que, em um cão imunizado contra um determinado sorogrupo, se for infectado naturalmente por outro sorogrupo, poderá desenvolver anticorpos contra o sorogrupo virulento que o está infectando em detrimento a cepa vacinal. Segundo MAILLOUX (1982) e LEVETT (2001) denomina-se este fenômeno de “Reação Paradoxal” e se deve a composição antigênica comum entre sorovares relacionados e também a uma suposta reação cruzada entre os sorovares de um mesmo sorogrupo ou mesmo entre sorogrupos distintos, que mesmo distantes compartilham “antígenos comuns”. Segundo os autores citados, este fenômeno de reações cruzadas na fase aguda também se deve à própria técnica de microaglutinação que se baseia nos complexos imunes promovidos pela imunoglobulina IgM que se sabe, carece de especificidade. Passada esta fase aguda, naturalmente ocorre o predomínio da imunoglobulina IgG mais específica, período em que o fenômeno paradoxal deixa de existir.

Perante o impasse verificado com relação às reações de aglutinação induzidas pelo antígeno vacinal de *icterohaemorrhagiae*, cuja resposta imunológica foi direcionada para o sorovar *copenhageni*, um experimento foi realizado, inoculando-se dois coelhos adultos, da raça Nova Zelândia, com cepas consideradas antígeno padrão em reações de microaglutinação. Um animal recebeu por via endovenosa, na veia marginal da orelha, inóculos contendo uma suspensão, inativada pelo calor (56°C /10 minutos), de *copenhageni* e o outro, cepa de *icterohaemorrhagiae*, segundo a técnica descrita pelo Manual de Leptospirose do Ministério da Saúde (FUNASA, 2001). Após 21 dias da primeira de uma série de três inoculações, foram colhidos cinco mililitros, por punção cardíaca, e verificados os títulos obtidos frente aos antígenos em questão. Também foi verificado se ocorreria o fenômeno de co-aglutinação. O soro do animal inoculado com o antígeno inativado de *icterohaemorrhagiae* apresentou título de 1/1600 direcionado para os dois antígenos (*icterohaemorrhagiae* e *copenhageni*), enquanto que, o animal inoculado com o antígeno de *copenhageni* apresentou título aglutinante de 1/1600 para o antígeno de *icterohaemorrhagiae* e 1/6400 para o antígeno de *copenhageni*. A diferença de títulos encontrada no animal inoculado com o antígeno *copenhageni* reforça novamente os achados de ARIMITSU *et al.* (1980), de que apesar destes sorovares compartilharem uma gama de antígenos comuns existem também aqueles

que só estão presentes no sorovar *copenhageni*. No entanto, os anticorpos comuns e direcionados para *Leptospira copenhageni* apresentaram atividade leptospiricida direcionada para ambos os sorovares com atividade maior para o antígeno indutor. Com relação ao animal inoculado com o antígeno *icterohaemorrhagiae*, também foi verificada atividade leptospiricida para ambos os antígenos em igual título. Em vista destes resultados, cai novamente por terra, a hipótese levantada por MASUDA *et al* (2003) de que houve uma seleção vacinal induzida pelas vacinações contendo antígeno *icterohaemorrhagiae*, possibilitando assim, as infecções pelo sorovar *copenhageni*. A sugestão de inclusão do sorovar *copenhageni* na composição das vacinas, é válida. Contudo, uma vez que este sorovar seja introduzido na composição vacinal não haveria a necessidade de incluir o sorovar *icterohaemorrhagiae*, já que a gama de antígenos do sorovar *copenhageni* é mais ampla e incluiria os antígenos do sorovar *icterohaemorrhagiae*, porém o inverso não é verdadeiro. Segundo LEVETT (2001), a imunidade é relativamente sorovar-específica e fortemente restrita ao sorovar homólogo ou àqueles intimamente relacionados. Parece ser esta a situação verificada no presente trabalho. Confirmando estes achados de co-aglutinação entre sorovares de mesmo sorogrupo, HERRMANN *et al.*, (1991) verificaram que cada um dos 14 sorovares pertencentes ao sorogrupo *icterohaemorrhagiae* possui sua própria característica genômica, com exceção dos sorovares *icterohaemorrhagiae* e *copenhageni* que são muito difíceis de ser distinguidos por métodos sorológicos, devendo possuir relação genética extremamente próxima. No presente experimento, as reações de micro-aglutinação pré-vacinais direcionadas para o sorovar *copenhageni* (Tabela 1) sofreram um incremento em seus títulos (Tabela 2) porque, como já foi dito, provavelmente tenha ocorrido uma infecção clínica que passou despercebida ou mesmo uma infecção sub-clínica. Ao serem vacinados com uma cepa vacinal de um sorovar de idêntico sorogrupo, houve uma reativação do clone de células de memória já presentes, e por isso, foi direcionado para o sorovar *copenhageni*, não induzindo a formação para o clone semelhante, especificamente, para a cepa vacinal. Parece claro que, o clone induzido por infecção natural, respondeu melhor ao ser “provocado” pelo sorovar relacionado, mesmo este sendo vacinal. O mesmo não pode se dizer das respostas vacinais obtidas por antígenos inativados, que utilizam cepas mortas de *Leptospira interrogans*. Caso isto não fosse verdade,

haveria uma resposta pós-vacinal igualmente intensa para os antígenos contidos na vacina. Na Tabela 2, os títulos direcionados para o sorovar *canicola*, situaram-se entre 1/25 e 1/100, sendo que, nove amostras (56%) mostraram-se anérgicas. Por outro lado, não foram igualmente verificadas reações aglutinantes direcionadas para o sorovar *icterohaemorrhagiae*, permanecendo assim, até o término do experimento.

Com a revacinação ocorrida aos 90 dias, não foram mais observadas, aos 30 dias após o *booster*, a abrupta elevação dos títulos direcionados para o sorovar *copenhageni*, permanecendo os títulos aglutinantes situados entre 1/25 (31,25%) e 1/50 (25%) e (43,75%) permanecendo anérgicos (Tabela 4). Estes dados estão de acordo com aqueles obtidos por LANGONI *et al.* (2002), que ao revacinarem 23 cães não observaram alterações nos títulos já anteriormente verificados. Porém, 60 dias após a revacinação (Tabela 4), alguns soros apresentaram títulos mais elevados que os anteriormente citados, situando-se entre 1/25 (6%), 1/50 (13%), 1/100 (25%) e 1/200(6%); enquanto (50%) mostraram-se anérgicos. Esta aparente reativação, com títulos mais altos aos 60 dias pós-revacinação, com queda aos 90 dias e reativação aos 120 dias (Tabela 5), pode ser em virtude do contato dos cães com o sorovar *copenhageni*, endemicamente, presente em roedores que habitam as cercanias do canil contaminando o ambiente e infectando os cães durante o experimento.

Com relação aos títulos aglutinantes pós-vacinais obtidos com os demais antígenos vacinais, todos se mostraram baixos. Ênfase deve ser dada para as respostas pós-vacinais direcionadas para o segundo sorovar mais importante afetando a espécie canina, o sorovar *canicola*, com títulos variando entre 1/25 e 1/50 em sua maioria, sendo que, apenas duas amostras reagiram com títulos de 1/100 e somente aos 30 dias pós-vacinais. Em se tratando à revacinação ou *booster* de reforço, verificou-se uma resposta mais efetiva para o sorovar *pomona* aos 30 dias pós-vacinais, com títulos variando entre 1/25 (19%) a 1/50 (75%), com apenas uma (6%) amostra anérgica (Tabela 4). Este sorovar, embora não tenha a importância dos anteriores considerados “urbanos” e endêmicos destes centros, no meio rural ele igualmente afeta uma grande gama de animais domésticos podendo inclusive infectar o homem (ACHA; SZYFRES, 2001). A escassa literatura especializada sobre reações pós-vacinais com imunógenos inativados de *Leptospira interrogans* em nosso país limita a discussão deste trabalho. Segundo DIESCH (1980) o título pós-vacinal considerado “protetor” para cães é aquele igual ou superior a 1/100 em

caso de sofrerem acidentalmente infecções ambientais. Também não há consenso sobre em que “média” situam-se os títulos pós-vacinais após imunização com inóculo bacteriano inativado contendo “X” UFC (unidades formadoras de colônias) contendo sorovares distintos (LANGONI *et al.* 2002). Igualmente são pobres as informações a respeito do período de permanência, ou das flutuações, para cima ou para baixo, destes títulos aglutinantes pós-vacinais (LANGONI *et al.* 2002). Tendo em vista que os títulos obtidos na presente pesquisa raramente ultrapassaram àquele preconizado por DIESCH (1980), este experimento serve como um alerta e tenta mostrar que vacinação não significa proteção. A melhor maneira de se obter uma imunização mais efetiva contra esta doença em cães, seria desvincular os antígenos inativados de *Leptospira interrogans* do “pool” de antígenos virais atenuados, que compõem normalmente as vacinas conhecidas e comercializadas com denominações de “Sêxtupla”, “Óctupla” e “Déctupla”, que seguramente, conferem uma imunidade mais duradoura por conterem vírus atenuados que, replicarão nos animais vacinados e conferirão uma resposta imune efetiva. Segundo APPEL (1999), vacinas polivalentes contendo vírus atenuados não exigem revacinações anuais contra as infecções sendo na maioria das vezes desnecessárias. Este procedimento desvinculatório baratearia os custos relacionados com as vacinas anti-virais liofilizadas, geralmente mais caras. Igualmente diminuiria os custos de produção com a bacterina específica anti-leptospira contendo os sorovares mais prevalentes em uma dada região. Poder-se-ia comercializar vacinas “urbanas” contendo os sorovares mais incidentes nas cidades e vacinas rurais contendo os sorovares mais prevalentes nessas áreas. Teria como desvantagem a necessidade de se efetuar revacinações com períodos mais curtos, do que as hoje prescritas. Esta prática, uma vez adotada e aceita do ponto de vista científico, independentemente dos títulos pós-vacinais alcançados, promoveria uma ativação freqüente de clones específicos, que responderiam rapidamente aos estímulos antigênicos proporcionados por uma infecção natural ou mesmo por uma revacinação. Esta proposta reforça a idéia de APPEL (1999) e RUSSELL e RUSSELL, (1994) de que as vacinações contra *Leptospira* deveriam ser realizadas num período mais curto de modo a reativar de maneira mais efetiva o clone de memória. E se contrapõe ao programa de vacinação recomendado pela AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION (AVMA,1989) o qual afirma que a vacina

contra leptospirose canina confere imunidade por um ano, devendo os animais ser imunizados com vacinas inativadas, com a primeira dose entre 10 a 12 semanas de idade, e a segunda, duas a três semanas após, com reforços anuais.

Parece evidente que, o procedimento proposto pela presente pesquisa trará aos clínicos veterinários e aos proprietários um maior grau de segurança para os seus animais e familiares, e de uma forma indireta, para a sociedade em geral.

## 6 CONCLUSÕES

1. O Sistema Imunológico de cães previamente infectados pelo sorovar *copenhageni* responde a vacinação pelo sorovar *icterohaemorrhagiae* com um efeito do tipo “booster”.
2. Anticorpos pré-formados contra *Leptospira copenhageni* não permitiram uma efetiva imunização com o sorovar *icterohaemorrhagiae* intimamente relacionado.
3. Os títulos aglutinantes obtidos com a vacina comercial contra a leptospirose, independentemente do sorovar, tornam-se indetectáveis pela técnica de Microaglutinação Microscópica, a partir dos 90 dias pós-vacinais, principalmente considerando-se diluições de 1/100.
4. A avaliação da ativação clonal pós-vacinal deve ser realizada utilizando-se titulações mais baixas daquelas preconizadas para avaliação de infecção.
5. Novos protocolos vacinais recomendando imunizações mais freqüentes deverão ser estabelecidos a fim de se obter uma proteção mais efetiva.
6. Há necessidade de maior fiscalização dos laboratórios produtores de vacinas contra a leptospirose canina, por parte do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, bem como de determinação de critérios padronizados capazes de avaliar a eficiência vacinal, dando assim, segurança aos consumidores.

## REFERÊNCIAS

- ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3 ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud. 2001. p. 175-186.
- ALVES, C.J.; ANDRADE, J.S.L.; VASCONCELOS, S. A.; MORAIS, Z.M.; AZEVEDO, S.S.; SANTOS, F.A. Avaliação dos níveis de aglutininas anti-leptospira em cães no município de Patos-PB, Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 1, p. 17-21, 2000.
- AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION. Canine and feline immunization guideline. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 195, p. 314-317, 1989.
- ANDRÉ-FONTAINE, G.; GANIÈRE J.P. **Leptospirose canine**. [s. l. : s. n.], [19\_?].
- APPEL, M.J. Forty years of canine vaccination. **Advances in Veterinary Medicine**, San Diego, v. 1, p. 309-324, 1999.
- ARDUÍNO, G.G.C.; GIRIO, R.J.S.; FREIRE, M.M.; MARCHIORI, 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, maio/jun. 2004.
- ARIMITSU, Y.; MORI, 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.
- 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.
- BAROCCHI, M.A.; KO, A.I.; FERRER, S.R.; FARIA, M.T.; REIS, M.G.; RILEY, L.W. Identification of new repetitive element in *Leptospira interrogans* serovar *Copenhageni* and its application to PCR – Based differentiation of *Leptospira* Serogroups. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 39, n. 1, p. 191-195, 2001.
- BARON, E. J.; PETERSON, L.R.; FINEGOLD, S.M. **Bailey e Scott's diagnostic microbiology**. 9th ed. Mosby, 1994.
- BEY, R.F.; JOHNSON, R.C. Immunogenicity and humoral and cell-mediated immune responses to leptospiral whole cell, outer envelope, and protoplasmic cylinder vaccines in hamsters and dogs. **American Journal Veterinary Research**, Schaumburg, v. 43, n. 5, p. 835-840, 1982.

BLOOD, D. C.; RADOSTITS, O. M. **Clínica Veterinária**. ed. 9ª. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A.2002. p. 637-646.

BOLIN, C. A. Clinical signs, diagnosis and prevention of leptospirosis in cattle. **Cattle Practice**, Gloucestershire, v. 9, p. 267-274, 1991.

BROUGHTON, E.S.; SCARNELL, J. Prevention of renal carriage of leptospirosis in dogs by vaccination. **Veterinary Record**, London, v. 117, p. 307-311, 1985.

CENTRO DE INFORMAÇÃO EM SAÚDE PARA VIAJANTES (CIVES). Disponível em:<<http://www.cives.ufrj.br>>. Acesso em: abril de 2005.

COLE, J.R.; SULZER, C.R.; PURSELL, A. R. Improved Microtechnique for the Leptospiral Microscopic Agglutination Test. **Applied Microbiology**, Washington, DC, v. 25, n. 06, p. 976-980,1973.

COLE, J.R.; SANGSTER, L.T.; SULZER, C.R.; PURSELL,A. R.; ELLINGHAUSEN, H. C. Infections with *Encephalitozoon cuniculi* and *Leptospira interrogans*, serovars *grippotyphosa* and ballum, in a kennel of Foxhounds. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 180, p. 435-437, 1982.

DICKESON, D.; LOVE, D. N. A serological survey of dogs, cats and horses in south-eastern Australia for leptospiral antibodies. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 70, n. 10. p. 389-390, 1993.

DIESCH, S. L. Leptospirosis-Vaccination and titer evaluation. **Modern Veterinary Practice**, Santa Barbara, v. 61, p. 905-908, 1980.

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

FAVERO, A. C. M.; PINHEIRO, S. R.;VASCONCELLOS, S. A. *et al.* Sorovares de *Leptospiras* predominantes em exames sorológicos de bubalinos, ovinos, caprinos, eqüinos, suínos e cães de diversos estados brasileiros. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 4, p. 613-619, 2002.

FORBES, B.A.; SAHM, D. F.; WEISSFELD, A. S. **Bailey e Scott's diagnostic microbiology**. 10th ed. Mosby, 1998.

FORD, R.B. Canine vaccination protocols. **Veterinary technology**, v. 13, p. 475-482, 1992.

FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE, MINISTÉRIO DA SAÚDE (FUNASA). **Manual de Controle da Leptospirose**. Brasília: Fundação Nacional da Saúde, Ministério da Saúde; 2001.

FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA (FAPESP). **SciELO publica estudo brasileiro sobre leptospira, 2004**. Disponível em <[http://www.agencia.fapesp.br/boletim\\_print.php?data\[id\\_materia\\_boletim\]=1595](http://www.agencia.fapesp.br/boletim_print.php?data[id_materia_boletim]=1595)> Acesso em: 28 março 2005.

GARCIA, M.; MARTINS, L.S. **Leptospirose**. Disponível em: <[http://www.mgar.vet.br/zoonosesaulas/aula\\_leptospirose.htm](http://www.mgar.vet.br/zoonosesaulas/aula_leptospirose.htm)> Acesso em: abril de 2005.

GENOVEZ, M.E.; SCARCELLI, E.; ROJAS.S.; GIORGI, W.; KANETO, C.N. Isolamentos bacterianos de fetos abortados de bovinos examinados no Instituto Biológico de São Paulo, no período de 1985 a 1992. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 107-112, 1993.

GENOVEZ, M.E. Leptospirose em cães. **Pet Vet**. Ano 1, n. 1, março/abril, 1996.

GREENE, C.E. **Infections diseases of the dog and cat**. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1988. p. 273-281.

GUERRA NETO, G.; GIRIO, R.J.S.; DE ANDRADE, T.M.; KOPROSKI, L. P.; DE MORAES, W.; DOS SANTOS, L. C. Ocorrência de anticorpos contra *Leptospira spp* em felídeos neotropicais pertencentes ao criadouro de animais silvestres da Itaipu Binacional e ao Zoológico Municipal Bosque Guarani, Foz do Iguaçu, estado do Paraná. **ARS Veterinária**, Jaboticabal, SP, v. 20, n. 1, p. 75-80, 2004.

HARTMAN, E.G.; HOUTEN, J.F.; VANDER DONK, J. A. Humoral immune response of dogs after vaccination against leptospirosis measured by an IgM and IgG-specific ELISA. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 7, p. 245-254, 1984.

HERRMANN, J. L.; BARIL, C.; BELLENGER, E.; PEROLAT, P. *et al.* Genome conservation in isolates of *Leptospira interrogans*. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 173, n. 23, p. 7582-7588, 1991.

HUHN, R.G.; BALDWIN, C.D.; CARDELLA, M.A. Immunity to Leptospirosis: Bacterins in Dogs and Hamsters. **American Journal Veterinary Research**, Schaumburg, v. 36, n. 1, p. 71-74, 1975.

KRAMER, T.T. Immunity to bacterial infections. **Veterinary Clinics of North America- Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 8, p. 683-695, 1978.

LACERDA, L.M.; GIRIO, R.J.S.; MARCHIORI FILHO, M.; MATHIAS, L.A. Pesquisa de aglutininas contra *Leptospira interrogans* sorovar *Wolffi*, nos soros sanguíneo e lácteo de bovinos em diferentes fases do período de lactação. **ARS Veterinária**, Jaboticabal, v. 18, n. 3, p. 294-299, 2002.

LANGONI, H.; CABRAL, K.G.; KRONFLY, C.S. Pesquisa de aglutininas anti-leptospíricas em gatos. **Clínica Veterinária**, São Paulo, n. 7, p. 24-26, 1998.

LANGONI, H.; PIMENTEL, V.L.; DA 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**, Jaboticabal, v. 18, n. 1, p. 54-61, 2002.

LARSSON, C. E.; SANTA ROSA, C. A.; LARSSON, M. H.; BIRGEL, E.H.; FERNANDES, W.R. ;PAIM, G.V. Laboratory and clinical features of experimental feline leptospirosis. **International Journal of Zoonoses**, Taipei, v. 12, n. 2, p. 111-119, 1985.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, DC, v. 14, n. 2, p. 296-326, 2001.

LEWIS, D.C.; DHEIN, C.R.; EVERMANN, J.F. Current concepts in vaccination programs for dogs, cats and ferrets, part 1. **Companion Animal Practice**, Santa Barbara, v. 2, p. 3-8, 1988.

MAILLOUX , M. Leptospira. In: MINOR, L.; VERON, M. **Bactériologie Médicale**. Paris: Flammarion, 1982. p. 722-730.

MARSHALL, V.; KERR, D. D. Early protection of dogs by *leptospira* bacterin. **Modern Veterinary Practice**, Santa Bárbara, v. 55, n. 6, p. 430-432, 1974.

MASUDA, E. K.; SKRABA, I.; GONÇALVES, M.L.L.; BIONDO, A.W. **Dinâmica dos sorovares da *Leptospira interrogans* em cães, de 1997 a 2003, em Curitiba e região metropolitana, Brasil**. Trabalho para Iniciação Científica da UFPR/TN, Curitiba, 2003.

MICHEL, V.; BRANGER,C.; ANDRE-FONTAINE, G. Epidemiology of leptospirosis. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, Havana, v. 54, n.1, p. 7-10, 2002.

MICHNA, S.W.; CAMPBELL, R.S.F.L Leptospirosis in wild animals. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v. 8, p. 101-106, 1970.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; KOBAYASHI, G.S.; PFALLER, M. A. **Medical Microbiology**. 3<sup>rd</sup> ed. : Mosby.1998

NASCIMENTO,A.L.T.O.; VERJOVSKI-ALMEIDA,S.;VAN SLUYS, M.A. *et al.* Genome features of *Leptospira interrogans* serovar *Copenhageni*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 459-478, 2004.

NAVARRO, C. E. K.; KOCIBA, G. J.; KOWALSKI, J. J. Serum biochemical changes in dogs with experimental *Leptospira interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae* infection. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 42, n. 7, p. 1125-1129, 1981.

NAVARRO, C. E. K.; KOCIBA, G. J. Hemostatic changes in dogs with experimental *Leptospira interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae* infection. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 43, n. 5, p. 904-906, 1982.

OLIVEIRA, S. J.; PIRES NETO, J.A.S. Aspectos etiológicos e de diagnósticos nas leptospiroses. **Revista Conselho Federal de Medicina Veterinária**, Brasília, Ano 10, n. 33, set/out/nov/dez 2004.

PHILLIPS, T.R.; JENSEN, J.L.; RUBINO, M.J.; YANG, W. C.; SCHULTZ, R.D. Effects of Vaccines on the Canine Immune System. **Canine Journal Research**, v. 53, p.154-160, 1989.

QUINN, P. J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.K.; CARTER, G.R. **Clinical veterinary microbiology**. London: Wolfe, 1994. 648 p.

RENDE, J. C.; ÁVILA, F.A. Leptospirose bovina: perfil epidemiológico e dinâmica da infecção como zoonose. **ARS Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 1, p. 71-79, 2003.

RIBEIRO, M. G. ; BELONI, S. N. ; LANGONI, H.; SILVA, A.V. Leptospirose canina. **Boletim técnico**. Departamento Técnico Fort Dodge Saúde Animal, [S.l.; s.n.], 2003

RIQUELME, M.J.M. **Diagnóstico por microaglutinação, imunofluorescência directa y aislamiento por cultivos**. Santiago-Chile, 1985. 51p. Tesis para optar al Título de Médico Veterinario y Licenciado em Ciências Pecuarias y Médico Veterinarias.

RUSSELL, F.B.; RUSSELL, C. J. Situação atual das vacinas de Leptospiras. In: PANDEY, R. **Microbiologia veterinária: perspectivas clínicas e moleculares**. São Paulo: Roca, 1994. 214p.

SAKATA, E.E.; YASUDA, P. H.; ROMERO, E. C. *et al.* . Sorovares de *Leptospira interrogans* isoladas de leptospirose em São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 34, n. 3, p. 217-221, 1992.

SANTA ROSA, C.A. Diagnóstico laboratorial da leptospirose. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.1,n 9,p. 97-109,1970.

SCHREIBER, 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, p. 113-118, 2005.

SECRETARIA DO ESTADO DO PARANÁ (SESA). **Leptospirose no Paraná**. Disponível em: <http://www.saude.pr.gov.br/>. Acesso em: dezembro de 2004.

SMYTHE, L. D.; SMITH, I. L.; SMITH, G. A. *et al.* . A quantitative PCR (TagMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. **BMC Infections Diseases**, v.2, n. 13, p. 1-7, 2002.

SNASHALL, D. Occupation infections. **Journal British Medical**, v. 313, n. 11-12, p. 551-556, 1996.

STRINGFELLOW, D.A.; BROWN, R.R.; SCHNURRENBERGER, P. R.; JOHNSON, J. Can antibody responses in cattle vaccinated with a multivalent leptospiral bacterin interfere with serologic diagnosis of disease? **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 182, n. 2, p. 165-167, 1983.

TAVARES NETO, J.T.; ANDRADE, J.; HOFER, E. ; OLIVEIRA, G.E.; JÚNIOR, A.C. Frequência de aglutininas para leptospira observadas em habitantes de Uberaba, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 1, p. 55-58, 1996.

TAPPERO; J. W.; ASHFORD, D.A.; PERKINS, B. A. **Leptospiras species** (Leptospirosis). [S.l., s.n.], 2002.

TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária: uma introdução**. 5. ed. São Paulo: Roca, 1998.

THIERMANN, A.B. Bovine leptospirosis: Bacteriologic versus serologic diagnosis of cows at slaughter. **American Journal Veterinary Research**, Schaumburg, v. 44, n. 12, p. 2244-2245, 1983.

THIERMANN, A.B.; GARRET, L.A. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to *Leptospira interrogans* serovars hardjo and pomona in cattle. **American Journal Veterinary Research**, Schaumburg, v. 44, n. 5, p. 884-887, 1983.

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

VASCONCELLOS, S. A.; JÚNIOR, O. B.; UMEHARA, O.; MORAIS, Z.M; CORTEZ, A; PINHEIRO, S.R. *et al.* Leptospirose bovina. Níveis de ocorrência e sorotipos predominantes em rebanhos dos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul. Período de janeiro a abril de 1996. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 7-15, 1997.

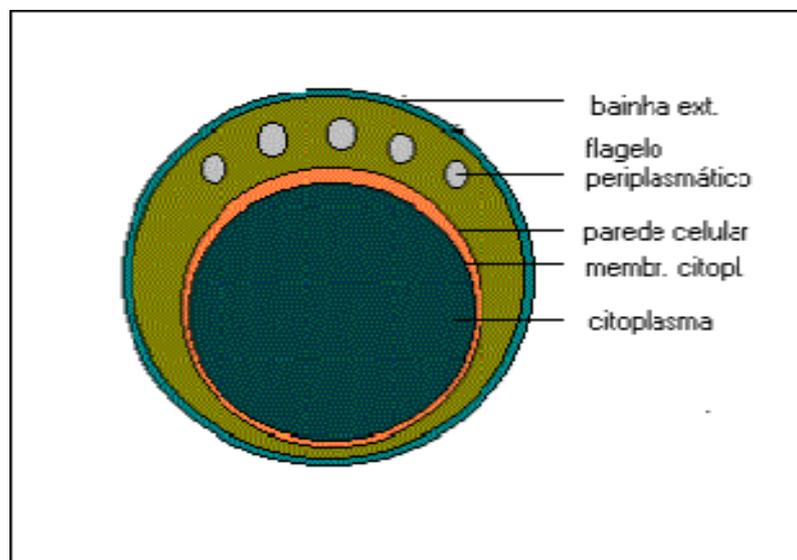
WORLD HEALTH ORGANIZATION/ INTERNATIONAL LEPTOSPIROSIS SOCIETY (WHO). **Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control**. Geneva: World Health Organization/International Leptospirosis Society; 2003.

YASUDA, P. H.; SANTA ROSA, C.A.; Correlação entre soroaglutinação e isolamento de leptospiras em cães. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 12, n. 2, p. 35-37, 1981.

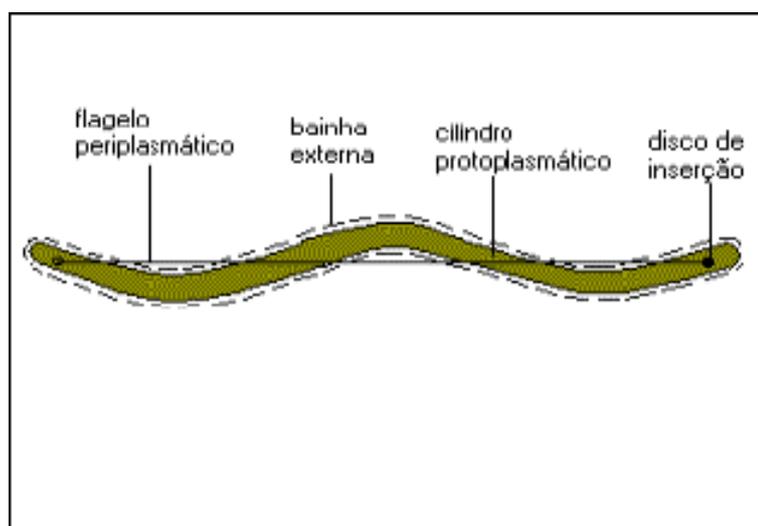
YASUDA, P. H.; STEIGERWALT, A. G. ; SULZER, K. R. *et al.* Desoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with proposals for seven new *Leptospira* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, DC, v. 37, p. 407-415, 1987.

**ANEXOS**

ANEXO 1 - ESQUEMA MORFOLÓGICO DA <i>Leptospira interrogans</i> .....	72
ANEXO 2 - ESQUEMA MORFOLÓGICO DA <i>Leptospira interrogans</i> .....	72
ANEXO 3 - SOROGRUPO E ALGUNS SOROVARES DA <i>Leptospira interrogans</i> SENSU LATO.....	73
ANEXO 4 - GENO ESPÉCIES DE <i>Leptospira</i> E SEUS SOROGRUPOS .....	74
ANEXO 5 - SOROVARES PERTENCENTES A MAIS DE UMA ESPÉCIE .....	75
ANEXO 6 - PRINCIPAIS DIFERENÇAS ENTRE OS GÊNEROS <i>Leptospira</i> , <i>Serpulina</i> , <i>Treponema</i> E <i>Borrelia</i> .....	76
ANEXO 7 - <i>Leptospira interrogans</i> , SEUS SOROVARES E HOSPEDEIROS.....	77
ANEXO 8 - PRINCIPAIS HOSPEDEIROS DAS LEPTOSPIRAS PATOGÊNICAS.....	78
ANEXO 9 - SINAIS CLÍNICOS OBSERVADOS EM ANIMAIS DOMÉSTICOS COM LEPTOSPIROSE. ....	79
ANEXO 10 -LEPTOSPIROSE NO BRASIL: CASOS CONFIRMADOS EM HUMANOS, POR LOCAL DE TRANSMISSÃO: 1989 – 1996.....	80
ANEXO 11 -PRINCIPAIS SOROVARES DO GÊNERO <i>Leptospira</i> ENCONTRADOS EM CÃES EM DIFERENTES MUNICÍPIOS DO BRASIL .....	81
ANEXO 12 -APRESENTAÇÃO DAS VACINAS COMERCIAIS NA INDÚSTRIA BRASILEIRA CONTENDO AS BACTERINAS PARA LEPTOSPIROSE.....	82

ANEXO 1 - ESQUEMA MORFOLÓGICO DA *Leptospira interrogans*

FONTE: QUINN, 1994

ANEXO 2 - ESQUEMA MORFOLÓGICO DA *Leptospira interrogans*

FONTE: QUINN, 1994

ANEXO 3 - SOROGRUPO E ALGUNS SOROVARES DA *Leptospira interrogans sensu lato*

<b>SOROGRUPOS</b>	<b>SOROVARES</b>
<b>Icterohaemorrhagiae</b>	<b>icterohaemorrhagiae, copenhageni, lai, zimbabwe</b>
Hebdomadis	hebdomadis, jules, kremastos
Autumnalis	autumnalis, fortbragg, bim, weerasinghe
Pyrogenes	pyrogenes
Bataviae	Bataviae
<b>Grippotyphosa</b>	<b>grippotyphosa, canalzonae, ratnapura</b>
<b>Canicola</b>	<b>canicola</b>
Australis	australis, bratislava, lora
<b>Pomona</b>	<b>pomona</b>
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

FONTE: LEVETT, 2001

ANEXO 4 - GENO ESPÉCIES DE *Leptospira* E SEUS SOROGRUPOS

ESPÉCIES	SOROGRUPOS
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae, <i>Canicola</i> , Pomona, Australis, Autumnalis, Pyrogenes, Grippotyphosa, Djasiman, Hebdomadis, Sejroe, Bataviae, Ranarum, Louisiana, Mini, Sarmin
<i>L. noguchii</i>	Panama, Autumnalis, Pyrogenes, Louisiana, Bataviae, Tarassovi, Australis, Shermani, Djasiman, Pomona
<i>L. santarosai</i>	Shermani, Hebdomadis, Tarassovi, Pyrogenes, Autumnalis, Bataviae, Mini, Grippotyphosa, Sejroe, Pomona, Javanica, Sarmin, Cynopteri
<i>L. meyeri</i>	Ranarum, Semarang, Sejroe, Mini, Javanica
<i>L. wolbachii</i> <sup>c</sup>	Codice
<i>L. biflexa</i> <sup>c</sup>	Semarang, Andamana
<i>L. fainei</i>	Hurstbridge
<i>L. borgpetersenii</i>	Javanica, Ballum, Hebdomadis, Sejroe, Tarassovi, Mini, Celledoni, Pyrogenes, Bataviae, Australis, Autumnalis
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa, Autumnalis, Cynopteri, Hebdomadis, Australis, Pomona, Djasiman, <i>Canicola</i> , Icterohaemorrhagiae, Bataviae
<i>L. weilii</i>	Celledoni, Icterohaemorrhagiae, Sarmin, Javanica, Mini, Tarassovi, Hebdomadis, Pyrogenes, Manhao, Sejroe
<i>L. inadai</i>	Lyme, Shermani, Icterohaemorrhagiae, Tarassovi, Manhao, <i>Canicola</i> , Panama, Javanica
<i>L. parva</i> <sup>c</sup>	Turneria
<i>L. alexanderi</i>	Manhao, Hebdomadis, Javanica, Mini

FONTE: LEVETT, 2001

## ANEXO 5 - SOROVARES PERTENCENTES A MAIS DE UMA ESPÉCIE

<b>SOROVARES</b>	<b>ESPÉCIES</b>
Bataviae	<i>L. interrogans</i> , <i>L. santarosai</i>
Bulgarica	<i>L. interrogans</i> , <i>L. kirschneri</i>
Grippotyphosa	<i>L. kirschneri</i> , <i>L. interrogans</i>
Hardjo	<i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. interrogans</i> , <i>L. meyeri</i>
Icterohaemorrhagiae	<i>L. interrogans</i> , <i>L. inadai</i>
Kremastos	<i>L. interrogans</i> , <i>L. santarosai</i>
Mwogolo	<i>L. kirschneri</i> , <i>L. interrogans</i>
Paidjan	<i>L. kirschneri</i> , <i>L. interrogans</i>
Pomona	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i>
Pyrogenes	<i>L. interrogans</i> , <i>L. santarosai</i>
Szwajizak	<i>L. interrogans</i> , <i>L. santarosai</i>
Valbuzzi	<i>L. interrogans</i> , <i>L. kirschneri</i>

FONTE: LEVETT, 2001

ANEXO 6 - PRINCIPAIS DIFERENÇAS ENTRE OS GÊNEROS *Leptospira*,  
*Serpulina/Treponema* E *Borrelia*

	<b>Leptospira</b>	<b>Serpulina/Treponema</b>	<b>Borrelia</b>
<b>Morfologia</b>	Muitos espirais finos e firmes	6-14 espirais regulares	4-8 espirais frouxos
<b>Comprimento</b>	6-20 µm	5-20µm	3-20µm
<b>Diâmetro celular</b>	0.1-0.2µm	0.1-0.5µm	0.2-0.5µm
<b>Flagelo periplasmático</b>	2	6-10	15-20
<b>Discos de inserção</b>	3-5	1	2
<b>Aa do peptidoglicano</b>	ác. diaminopimélico	ornitina	ornitina
<b>Respiração</b>	aeróbio	microaeróbio ou anaeróbio	microaeróbio
<b>Produção de catalase</b>	presente	ausente	Ausente
<b>Fonte de energia</b>	ác. graxo de cadeia longa	carboidrato e/ou aminoácido	carboidrato
<b>Transmissão por artrópodes</b>	não	não	sim
<b>Enfermidade causada</b>	leptospirose	sífilis, pinta, borreliose	febre recidivante, enfermidade de Lyme

FONTE: QUINN, 1994

ANEXO 7 - *Leptospira interrogans*, SEUS SOROVARES E HOSPEDEIROS

SOROGRUPO	SOROVAR	BOVINOS	SUÍNOS	CANINOS	EQUINOS	OVINOS	ROEDORES	SELVAGENS
<b>Australis</b>	<i>australis</i>	+						+
	<i>bratislava</i>	+	+		+			
<b>Autumnalis</b>	<i>autumnalis</i>						+	+
<b>Ballum</b>	<i>ballum</i>						+	+
<b>Bataviae</b>	<i>bataviae</i>	+					+	
<b>Canicola</b>	<i>canicola</i>	+	+	+			+	+
<b>Grippotyphosa</b>	<i>grippotyphosa</i>	+	+	+	+		+	+
<b>Hebdomadis</b>	<i>hebdomadis</i>							+
	<i>szwajizak</i>	+						
<b>Ictero- haemorrhagia e</b>	<i>ictero- haemorrhagiae</i>	+	+	+	+		+	+
	<i>copenhageni</i>	+		+			+	
<b>Pomona</b>	<i>pomona</i>	+	+	+	+	+		+
<b>Sejroe</b>	<i>balcanica</i>	+			+	+		
	<i>hardjo</i>	+						
	<i>saxkoebing</i>	+						
	<i>sejroe</i>	+					+	+
<b>Tarassovi</b>	<i>tarassovi</i>		+					

FONTE: QUINN, 1994

## ANEXO 8 - PRINCIPAIS HOSPEDEIROS DAS LEPTOSPIRAS PATOGÊNICAS

<b>L. interrogans / SOROVARES</b>	<b>PRINCIPAIS HOSPEDEIROS</b>	<b>HOSPEDEIROS ACIDENTAIS</b>
<i>autumnalis</i>	animais silvestres	-
<i>ballum</i>	animais silvestres	-
<i>bratislava</i>	suínos/ eqüinos/ bovinos	-
<i>canicola</i>	caninos	suínos/ bovinos/ roedores
<i>grippotyphosa</i>	animais silvestres	suínos/ bovinos
<i>hardjo</i>	bovinos	ovinos
<i>icterohaemorrhagiae</i>	roedores	suínos/ bovinos/ caninos
<i>pomona</i>	suínos/ bovinos	caninos / animais silvestres

FONTE: QUINN, 1994

ANEXO 9 - SINAIS CLÍNICOS OBSERVADOS EM ANIMAIS DOMÉSTICOS COM LEPTOSPIROSE.

HOSPEDEIRO	SINAIS CLÍNICOS
<b>Bovinos</b>	<p>Subclínica com ou sem leptospirúria;</p> <p>Síndrome da queda do leite com ou sem outros sintomas (<i>hardjo</i>);</p> <p>Abortos seguidos (<i>pomona</i>) ou esporádicos (<i>hardjo</i>) e mortalidade neonatal;</p> <p>Infertilidade (<i>hardjo</i>);</p> <p>Hemoglobinúria, icterícia e febre em bezerros, e menos comumente em adultos (<i>pomona</i>, <i>grippotyphosa</i> e <i>icterohaemorrhagiae</i>). Ocasionalmente muitos animais mostram sinais de meningite.</p>
<b>Suínos</b>	<p>Subclínica, muitas vezes com leptospirúria (especialmente com <i>pomona</i>). Suínos são considerados hospedeiros de manutenção;</p> <p>Febre e mastite focal não-supurativa e leptospirúria;</p> <p>Infertilidade, abortos e natimortos (<i>canicola</i>, <i>pomona</i> e <i>icterohaemorrhagiae</i>);</p> <p>Febre, anorexia, icterícia, hemoglobinúria e alta mortalidade de jovens animais (<i>icterohaemorrhagiae</i>).</p>
<b>Cães</b>	<p>Subclínica com leptospirúria (<i>canicola</i>);</p> <p>Doença da hemorragia aguda: febre, vômito, prostração e morte rápida (usualmente <i>icterohaemorrhagiae</i>);</p> <p>Tipo de icterícia aguda: intenso prurido, depressão, febre, hemorragias na urina e fezes (<i>canicola</i> e <i>icterohaemorrhagiae</i>);</p> <p>Tipo de uremia: uremia associada com extensa lesão renal, estomatite ulcerativa. Alta letalidade. Os sinais clínicos severos podem ocorrer entre 1-3 anos após infecção inicial (<i>canicola</i>);</p> <p>Alteração da atividade hepática, raramente crônica (<i>grippotyphosa</i>).</p>
<b>Eqüinos</b>	<p>Uveíte recorrente crônica, podendo causar cegueira;</p> <p>Ocasionalmente causa aborto;</p> <p>Raramente causa febre, anorexia, depressão e icterícia.</p>
<b>Ovelhas</b>	<p>Principalmente infecções subclínicas com leptospirúria (<i>hardjo</i>);</p> <p>Ocasionalmente ocorre casos agudos com depressão, dispnéia, hemoglobinúria, anemia e alta mortalidade cordeiros.</p>

FONTE: QUINN, 1994

**ANEXO 10 - LEPTOSPIROSE NO BRASIL: CASOS CONFIRMADOS EM HUMANOS, POR LOCAL DE TRANSMISSÃO: 1989 – 1996**

<b>Região/Ano</b>	<b>1989</b>	<b>1990</b>	<b>1991</b>	<b>1992</b>	<b>1993</b>	<b>1994</b>	<b>1995</b>	<b>1996</b>
<b>Norte</b>	314	399	477	422	376	634	841	684
<b>Nordeste</b>	1483	1034	856	606	467	1026	1467	987
<b>Sudeste</b>	622	727	1356	728	621	747	1202	3065
<b>Sul</b>	87	241	312	308	255	427	679	509
<b>Centro-Oeste</b>	2	8	16	32	10	60	71	36
<b>Total</b>	2508	2409	3017	2096	1729	2894	4260	5281

FONTE: Ministério da Saúde (FUNASA), 2001

ANEXO 11 - PRINCIPAIS SOROVARES DO GÊNERO *Leptospira* ENCONTRADOS EM CÃES EM DIFERENTES MUNICÍPIOS DO BRASIL

AUTORES	LOCAL	Nº DE AMOSTRAS EXAMINADAS	Nº DE AMOSTRAS REAGENTES (%)	PRINCIPAIS SOROVARES
<b>Santa Rosa et al., 1974</b>	Belo Horizonte-MG	136	8 (5.9)	<i>icterohaemorrhagiae</i> (2.9) <i>tarassovi</i> (1.5) <i>pomona</i> (0.7) <i>pyrogenes</i> (0.7)
<b>Yasuda et al., 1980</b>	São Paulo -SP	1428	308 (21.6)	<i>canicola</i> (50.7) <i>icterohaemorrhagiae</i> (25.5) <i>grippotyphosa</i> (7.8) <i>pomona</i> (6.7)
<b>Ávila et al., 1998</b>	Pelotas - RS	425	143 (34.8)	<i>canicola</i> (58.1) <i>icterohaemorrhagiae</i> (20.9) <i>copenhageni</i> (11.4) <i>grippotyphosa</i> (2.7)
<b>Alves et al., 2000</b>	Patos - PB	114	23 (20)	<i>autumnalis</i> (34.8) <i>grippotyphosa</i> (13.0)
<b>Lilenbaum et al., 2000</b>	Oriximina - PA	185	34 (18.4)	<i>icterohaemorrhagiae</i> (10.3) <i>canicola</i> (6.0) <i>copenhageni</i> (4.9)
<b>Modolo et al., 2000</b>	Botucatu - SP	775	119 (15.4)	<i>canicola</i> (64.7) <i>pyrogenes</i> (50.4) <i>icterohaemorrhagiae</i> (14.3) <i>copenhageni</i> (14.3) <i>pomona</i> (4.2) <i>grippotyphosa</i> (1.6)
<b>Viegas et al., 2001</b>	Salvador - BA	120	102 (85.0)	<i>canicola</i> (25.0) <i>icterohaemorrhagiae</i> (23.3) <i>autumnalis</i> (35.0) <i>grippotyphosa</i> (10.0) <i>pyrogenes</i> (12.5) <i>pomona</i> (1.6)
<b>Mascolli et al., 2002</b>	Santana de Parnaíba - SP	410	61 (15.0)	<i>copenhageni</i> (24.4) <i>canicola</i> (16.0) <i>hardjo</i> (16.0)
<b>Silva, 2003</b>	Botucatu - SP	1000	179 (17.9)	<i>castellonis</i> (28.7) <i>autumnalis</i> (19.1) <i>pyrogenes</i> (17.7) <i>icterohaemorrhagiae</i> (11.0) <i>canicola</i> (9.6)

FONTE: RIBEIRO, 2003

**ANEXO 12 - APRESENTAÇÃO DAS VACINAS COMERCIAIS NA INDÚSTRIA  
BRASILEIRA CONTENDO AS BACTERINAS PARA LEPTOSPIROSE.**

Vacina	Fabricante	Espécies	SOROTIPOS/SOROVARES
Canigen CH(A2)PL* e PPI/LR*	Virbac	C	<i>canicola</i> e <i>icterohaemorrhagiae</i>
CanigenCHa2 PPI/LCV*	Virbac	C	<i>canicola</i> e <i>icterohaemorrhagiae</i>
Canigen L	Virbac	C	<i>canicola</i> e <i>icterohaemorrhagiae</i>
Cattle Master 4+L5*	Pfizer	B	<i>canicola</i> , <i>grippotyphosa</i> , <i>hardjo</i> , <i>icterohaemorrhagiae</i> e <i>pomona</i> .
Eurican CHPL*	Merial	C	<i>canicola</i> e <i>icterohaemorrhagiae</i>
Eurican CHPLR*	Merial	C	<i>canicola</i> e <i>icterohaemorrhagiae</i>
Farrowsure B*	Pfizer	S	<i>canicola</i> , <i>grippotyphosa</i> , <i>hardjo</i> , <i>icterohaemorrhagiae</i> , <i>pomona</i> e <i>bratislava</i> .
Galaxy DA2 P+L*	Fort Dodge	C	<i>canicola</i> e <i>icterohaemorrhagiae</i>
Galaxy DA2 PPV L*	Fort Dodge	C	<i>canicola</i> e <i>icterohaemorrhagiae</i>
Lepto 5 Tipos	Merial	B	<i>canicola</i> , <i>grippotyphosa</i> , <i>icterohaemorrhagiae</i> , <i>hardjo</i> , <i>pomona</i> .
Lepto Bac	Fort Dodge	C	<i>canicola</i> e <i>icterohaemorrhagiae</i>
Lepto Bac 6	Fort Dodge	B E S	<i>canicola</i> , <i>grippotyphosa</i> , <i>icterohaemorrhagiae</i> , <i>pomona</i> , <i>wolffi</i> e <i>hardjo</i> .
Lepto-Bov-6	Vallée	B	<i>hardjo</i> ; <i>pomona</i> ; <i>wolffi</i> ; <i>canicola</i> ; <i>grippotyphosa</i> ; <i>icterohaemorrhagiae</i> .
Leptoferm 5/2ml	Pfizer	B S	<i>canicola</i> , <i>grippotyphosa</i> , <i>harjo</i> , <i>icterohaemorrhagiae</i> e <i>pomona</i> .
Leptospirovac-B	IRFA	B	<i>hardjo</i> , <i>icterohaemorrhagiae</i> , <i>bratislava</i> , <i>pomona</i> .
Leptospirovac-C	IRFA	C	<i>canicola</i> e <i>icterohaemorrhagiae</i>
Leptospirovac-S	IRFA	S	<i>canicola</i> , <i>icterohaemorrhagiae</i> , <i>pomona</i> , <i>bratislava</i> , <i>hardjo</i> .
Leptovac 6	Hertape	B O Cp S	<i>canicola</i> , <i>grippotyphosa</i> , <i>hardjo</i> , <i>icterohaemorrhagiae</i> , <i>pomona</i> , <i>wolffi</i> ,
Leptovacin	Bio-vet	B O Cp E C G	<i>canicola</i> , <i>icterohaemorrhagiae</i> , <i>copenhageni</i> , <i>pomona</i> , <i>grippotyphosa</i> e <i>bratislava</i> .
Multi-Dog*	Hertape	C	<i>canicola</i> , <i>icterohaemorrhagiae</i> , <i>pomona</i> e <i>grippotyphosa</i>
Nobivac L	Intervet	C	<i>canicola</i> e <i>icterohaemorrhagiae</i>
Octa-Cino-Vacin*	Bio-vet	C	<i>canicola</i> e <i>icterohaemorrhagiae</i>
Parvo Lepto 6*	Fort Dogde	S	<i>pomona</i> , <i>grippotyphosa</i> , <i>canicola</i> , <i>icterohaemorrhagiae</i> , <i>wolffi</i> e <i>hardjo</i> .
Poli-Cino-Vacin*	Bio-vet	C	<i>canicola</i> e <i>icterohaemorrhagiae</i>
Six-Dog*	Hertape	C	<i>canicola</i> e <i>icterohaemorrhagiae</i>
Suvaxyn L6	Fort Dogde	S	<i>pomona</i> , <i>grippotyphosa</i> , <i>canicola</i> , <i>icterohaemorrhagiae</i> , <i>bratislava</i> , <i>hardjo</i> .
Tandem 9K*	Merial	B	<i>canicola</i> , <i>grippotyphosa</i> , <i>hardjo</i> , <i>icterohaemorrhagiae</i> e <i>pomona</i> .

Tissuvax 3*	Coopers	C	<i>canicola</i> e <i>icterohaemorrhagiae</i>
Tissuvax Max*	Coopers	C	<i>canicola</i> e <i>icterohaemorrhagiae</i>
Tri-Cino-Vacin*	Bio-Vet	C	<i>canicola</i> e <i>icterohaemorrhagiae</i>
Tri-Dog*	Hertape	C	<i>canicola</i> e <i>icterohaemorrhagiae</i>
Tridog*	Vallée	C	<i>canicola</i> e <i>icterohaemorrhagiae</i>
Vacina Quadrivac*	Leivas	C	<i>canicola</i> e <i>icterohaemorrhagiae</i>
Vanguard 5/CV-L*	Pfizer	C	<i>canicola</i> e <i>icterohaemorrhagiae</i>
Vanguard DA2PL*	Pfizer	C	<i>canicola</i> e <i>icterohaemorrhagiae</i>
Vanguard HTLP 5/CV-L*	Pfizer	C	<i>canicola</i> e <i>icterohaemorrhagiae</i>
Vencosix-Plus*	Vencofarma	C	<i>canicola</i> e <i>icterohaemorrhagiae</i>
Vencothree*	Vencofarma	C	<i>canicola</i> e <i>icterohaemorrhagiae</i>
Vencothree-Plus*	Vencofarma	C	<i>canicola</i> e <i>icterohaemorrhagiae</i>

\* vacinas associadas B: bovinos; C: cães, Cp: caprinos, E: eqüinos, G: gatos, O: ovinos, S: suínos

FONTE: GARCIA, 2005