



**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE E  
MEDICINA INVESTIGATIVA**

**TESE DE DOUTORADO**

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DO CÃO COMO RESERVATÓRIO NA  
TRANSMISSÃO DA LEPTOSPIROSE URBANA**

**DEBORAH BITTENCOURT MOTHÉ FRAGA**

Orientador: Dr. Mitermayer Galvão dos Reis

Co-orientador: Dr. Albert Icksang Ko

Salvador-Bahia  
2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa

**DEBORAH BITTENCOURT MOTHÉ FRAGA**

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DO CÃO COMO RESERVATÓRIO NA  
TRANSMISSÃO DA LEPTOSPIROSE URBANA**

Tese submetida à coordenação de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, Fundação Oswaldo Cruz, para a obtenção do Título de Doutor.

Orientador: Dr. Mitermayer Galvão dos Reis  
Co-orientador: Dr. Albert Icksang Ko

Salvador-Bahia  
2008

A minhas queridas filhas, Carolina e Beatriz,  
pelo amor e compreensão dos muitos momentos ausentes.

A meu marido e companheiro, Bira,  
pelo amor, carinho e incentivo sempre.

A minha família e amigos,  
pela sustentação, apoio e incentivo.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus orientadores Mitermayer e Albert, por sua atenção e paciência e por todos os ensinamentos relacionados à ciência e a pesquisa.

Agradeço a Andréia Carvalho dos Santos, pela amizade, companheirismo, apoio diário e muita ajuda na realização deste trabalho.

Agradeço a Adriano Queiroz, pela paciência, pelos ensinamentos na arte da MAT, pela amizade, companheirismo, e colaboração na realização deste trabalho.

Agradeço a Fernanda de Souza Santos, Paulo Camarotti, Manuela Solcà e outros estudantes por mim orientados que me deram o prazer de exercer a docência, lhes transmitindo muitos conhecimentos durante a realização deste trabalho, mas que também contribuíram para o meu constante aprendizado.

Agradeço a Rosan Barbosa Matos, Renato Reis e Ridalva Dias Martins Felzemburgh que contribuíram para a construção destes resultados.

Agradeço a todos os outros estudantes e membros do grupo que contribuíram para a construção destes resultados.

Agradeço a Flávia e Alan McBride, Fabienne Paiva, Vitor Maffili, Everton Fagonde da Silva, Cleiton Santos Silva e demais amigos da Fiocruz pela amizade, convívio e apoio.

AGRADECIMENTO ESPECIAL aos moradores de Pau da Lima e seus cães que aceitaram participar deste trabalho.

Aos meus pais, irmãs, sobrinhos e demais familiares que me incentivam sempre a ir em frente.

A Ubiracy, Carolina e Beatriz pelo amor incondicional, carinho e apoio sempre.

## RESUMO

A leptospirose é uma zoonose de importância global. Em diversas cidades brasileiras, transformou-se em uma séria ameaça à saúde pública. Leptospiras patogênicas são carregadas por diversos mamíferos, e os cães são, junto com os roedores, reservatórios potenciais para infecção humana nos ambientes urbanos. Nos locais endêmicos, os cães domésticos podem atuar como reservatórios para a infecção humana por leptospiras. A estreita relação entre as pessoas e os cães pode facilitar a transmissão de cepas de leptospira originalmente carregadas pelos ratos devido ao freqüente contato entre os cães e roedores peridomiciliares. O objetivo do estudo foi determinar se os cães domésticos contribuem para a transmissão urbana da leptospirose para humanos e outros animais. Um estudo de corte transversal foi realizado de junho a outubro de 2005 com cães domésticos e os seus proprietários em Pau da Lima, uma comunidade carente na cidade de Salvador, Brasil. Dos 61 domicílios incluídos no estudo, um total de 97 cães foi avaliado e 36 deles foram soropositivos, resultando em 37% de prevalência. Os fatores de risco para a infecção canina por leptospiras foram identificados como idade  $\geq 24$  meses, raça mestiça e o hábito de caçar ratos. Além disso, residir na zona mais pobre, a  $\leq 5$  metros acima do ponto mais baixo no vale e presença de vegetação próxima ao domicílio também foram fatores identificados como associados a soroprevalência. O sorogrupo infectante previsto pelo teste de microaglutinação em 83% dos cães foi o *Icterohaemorrhagiae*. Os dois isolados obtidos de amostras de urina dos cães foram caracterizados como pertencentes ao mesmo sorogrupo através de sorogrupagem. Os isolados dos cães foram comparados por VNTR, com cepas isoladas em Salvador de um rato e de um caso humano de leptospirose grave, e todos os três exibiram o mesmo perfil genético. Uma associação positiva foi observada entre a soroprevalência de cães soropositivos e os

proprietários desses cães. Os dados apresentados nos permitem concluir que os cães de áreas endêmicas e pobres da cidade de Salvador apresentam freqüente contato com roedores, exibem alta soroprevalência para aglutininas anti-leptospira, e podem representar quando infectados, um fator de risco para exposição humana as leptospiros patogênicas.

## ABSTRACT

Leptospirosis is a zoonosis of global importance. It has become a serious health threat in several Brazilian cities. Pathogenic leptospire are carried by several mammals; dogs are along with rodents potential sources of human infection in the urban environments. In places where the disease is endemic, domestic dogs may act as reservoirs for leptospiral infection to humans. Close relationship between the canine and human populations may facilitate transmission of strains originally carried by rats, since dogs may acquire infection due to their common contact with peridomestic rodents. The aim of the study was to determine whether domestic dogs contribute for the urban transmission of leptospirosis. A cross-sectional serosurvey was performed from June to October 2005 in domestic dogs and their owners in Pau da Lima, a slum community in the city of Salvador, Brasil. From 61 households, a total of 97 dogs were enrolled and 36 of them were seropositive, resulting in a prevalence of 37%. Risk factors for canine leptospirosis infection were identified to be age  $\geq$  24 months, mixed-breed and rat hunting. Additional risk factors included resided in the poorest zone, in a household located  $\leq$  5 meters above lowest point in the valley and vegetation near to the household. The serogroup Icterohaemorrhagiae was recognized as most common predicted infective serogroup (83%) by microscopic agglutination test in canine serum samples. Two isolates obtained from canine urine samples were characterized as the same serogroup by serogrouping. Canine isolates were compared by variable number of tandem repeats (VNTR) analysis with clinical strains from one rat and one human being case of severe leptospirosis, both from Salvador, and all three exhibited the same DNA fingerprinting. A positive association was observed between human seroprevalence and being owner of seropositive



dogs. Thus, we concluded that dogs from poor community of Salvador, endemic for leptospirosis, have common contact with rodents, exhibit a high seroprevalence for antileptospiral agglutinins and represent a risk factor for human exposure to pathogenic leptospires.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ArcGIS:** Programa para análises de dados espaciais

**CDC:** Centro para Controle e Prevenção de Doenças, EUA

**CI:** Intervalo de confiança

**CONDER:** Companhia de Desenvolvimento Urbano do Estado da Bahia

**Epi Info:** Programa para análises de dados estatísticos

**GAM:** Modelos aditivos generalizados

**GIS:** Sistema de Informação Geográfica

**MAT:** Teste de microaglutinação

**m:** metros

**N:** Número

**NS:** Não significativa

**OR:** Odds Ratio

**PCR:** Reação em cadeia da polimerase

**R:** Programa para análises de dados estatísticos

**SD:** Desvio padrão

**SIG:** Sistema de Informação Geográfica

**SVS :** Secretaria de Vigilância Sanitária

**VNTR:** Variable number tandem repeat

**WHO:** Organização Mundial de Saúde

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>CAPÍTULO 2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>22</b>
<b>CAPÍTULO 3. OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
<b>CAPÍTULO 4. MANUSCRITO.....</b>	<b>25</b>
<b>Cães Domésticos como Reservatórios da Leptospirose em Favelas</b>	
<b>Urbanas.....</b>	<b>26</b>
<b>CAPÍTULO 5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>67</b>
<b>CAPÍTULO 6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>71</b>
<b>CAPÍTULO 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>72</b>

# 1. Introdução

## 1.1 A leptospirose

A leptospirose é uma zoonose de ampla distribuição mundial causada por espiroquetas do gênero *Leptospira* spp.(Faine *et al.*, 1999; Levett, 2001; Bharti *et al.*, 2003). Este foi dividido em duas espécies: *Leptospira interrogans*, que agrupa mais de 200 sorovares patogênicas e *L. biflexa*, com mais de 60 sorovares saprófitas. Os sorovares antigenicamente relacionados são agrupados em sorogrupos (Levett, 2001). Em geral, os diferentes sorovares são seletivamente associados a animais que atuam como reservatórios, mantendo as leptospiras em diferentes locais e perpetuando a transmissão da leptospirose na natureza. Logo, a identificação do sorovar infectante é de grande importância em estudos epidemiológicos devido à possibilidade de correlação com os possíveis reservatórios envolvidos na transmissão (Bharti *et al.*, 2003).

A infecção por leptospiras pode provocar doença tanto no homem como nos animais. A leptospirose no homem historicamente foi considerada uma doença essencialmente rural e ocupacional, acometendo fazendeiros, agricultores, veterinários, trabalhadores em contato com esgoto ou lixo, mineradores, soldados, dentre outras ocupações que apresentam maior risco de contrair leptospirose (Russell *et al.*, 2003; Goncalves *et al.*, 2006; Hadad *et al.*, 2006; Swapna *et al.*, 2006). Mais recentemente, a leptospirose vem sendo associada com atividade recreacional (De Lima *et al.*, 1990) e práticas esportivas como no ecoturismo e competições de canoagem (Boland *et al.*, 2004) e triathlon (Morgan *et al.*, 2002). Além disso, a

leptospirose é hoje uma importante doença de grandes metrópoles de países em desenvolvimento, principalmente devido ao crescimento desordenado, às precárias condições sanitárias de áreas urbanas pobres e à facilidade de enchentes nas estações chuvosas. Estas características de grandes áreas urbanas pobres (favelas) promovem as condições ecológicas favoráveis à infestação por roedores e transmissão de doenças a eles relacionadas (Pereira e Andrade, 1988; 1990; Ko *et al.*, 1999; De Figueiredo *et al.*, 2001; Sarkar *et al.*, 2002; Romero *et al.*, 2003; Tassinari *et al.*, 2008).

Mais de 3000 casos de leptospirose grave são confirmados anualmente no Brasil, principalmente após período de chuvas, com letalidade maior que 10% em epidemias nas grandes cidades (Ministério da Saúde, Brasil, 2008). Em 1996, na cidade de Salvador, foram descritos mais de 300 casos de leptospirose grave, com 50 óbitos (Ko *et al.*, 1999). Um estudo caso-controle realizado em 2000, com casos graves de leptospirose ocorridos em Salvador, identificou fatores de risco para aquisição de leptospirose em locais endêmicos durante as epidemias relacionadas às chuvas. Dentre eles, a proximidade da residência a esgotos abertos, alagamento e presença de ratos próxima a casa (Sarkar *et al.*, 2002). Outro estudo caso controle realizado em Salvador, em 2001, avaliou casos decorrentes de comunidades carentes e identificou a transmissão como peridomiciliar. Dentre os membros residentes na mesma casa de um caso de leptospirose, 30% destes apresentavam evidência de infecção prévia por *Leptospira* (Maciel *et al.*, 2008).

No município do Rio de Janeiro em 1996 ocorreu uma grande epidemia urbana após forte período de chuvas com 1.732 casos suspeitos e 51 mortes. O georreferenciamento de 87 destes casos identificados no Rio de Janeiro verificou maior ocorrência em áreas sujeitas à

inundação e acúmulo de lixo (Barcellos e Sabroza, 2000; Barcellos e Sabroza, 2001; Tassinari *et al.*, 2004). Um estudo sorológico de leptospirose humana compreendendo 29 anos em São Paulo mostra que esta doença é endêmica neste estado com 9.335 casos de leptospirose humana diagnosticados entre 1969 e 1997, concentrados entre janeiro e abril de cada ano, sendo estes meses que concentram as mais altas médias pluviométricas. Picos de incidência foram observados em 1991 e 1996, anos com altos índices pluviométricos. Há uma predominância de casos na grande São Paulo, onde se concentram 68.43% dos casos (Romero *et al.*, 2003). Geralmente as taxas de incidência para leptospirose são subestimadas devido à falta de registros da doença, assim como às diversas formas de manifestações clínicas que se confundem com outras patologias e a ausência de testes diagnósticos rápidos e eficientes (Bharti *et al.*, 2003).

Pessoas acometidas por leptospirose podem desenvolver infecção assintomática, com sintomatologia leve, ou a forma grave também denominada de Síndrome de Weil (Bovet *et al.*, 1999; Ashford *et al.*, 2000; Levett, 2001). A forma leve da doença na maioria das vezes é confundida com outras doenças febris, auto-limitadas, todavia, 5 a 15% dos casos podem progredir para a forma mais grave, caracterizada por insuficiência renal aguda, alterações hepáticas, icterícia, hemorragias e letalidade entre 5 a 15% (Merien e Perolat, 1996). Outra forma de apresentação da leptospirose grave é associada à pneumonite e hemorragia pulmonar sendo conhecida como síndrome de hemorragia pulmonar grave associada à leptospirose (SHPS), quando a letalidade pode chegar a 74% (Gouveia *et al.*, 2008). A ocorrência de manifestações clínicas variadas já foi explicada pela diferença de virulência entre sorovares, no entanto, esta hipótese foi refutada posteriormente (Natarajaseenivasan *et al.*, 2005; Goldstein *et al.*, 2006; Geisen *et al.*, 2007).

A leptospirose em humanos é transmitida através do contato com animais portadores (reservatórios) ou água e/ou solo contaminado pela urina destes animais infectados. Leptospiras patogênicas podem sobreviver por longos períodos sobre condições ambientais diversas em água contaminada (Faine *et al.*, 1999; Ganoza *et al.*, 2006).

## 1.2 Reservatórios

Diversos mamíferos podem estar envolvidos na transmissão devido a possibilidade de carrearem Leptospiras patogênicas, dentre eles os ratos, cães, bovinos, suínos e marsupiais (Levett, 2001; Bharti *et al.*, 2003). O rato é considerado o principal reservatório na transmissão da leptospirose para humanos no ambiente urbano (Pereira e Andrade, 1988; 1990; Vinetz *et al.*, 1996; Faria *et al.*, 2008). Um estudo realizado em Salvador com a captura de ratos próxima as casas de casos de leptospirose grave demonstrou alta taxa de ratos infectados capturados (80,3%). Todos isolados de ratos capturados foram identificados como pertencentes ao sorovar Copenhageni, mesmo sorovar identificado nos isolados de pacientes humanos (Faria *et al.*, 2008). Os sorovares do sorogrupo Icterohaemorrhagiae cujo principal hospedeiro é o rato, são os mais incidentes nos ambientes urbanos.

## 1.3 O cão como reservatório

Apesar do papel dos ratos na transmissão da leptospirose estar bem definido, os cães também são reservatórios importantes (Trevejo *et al.*, 1998), sendo considerados, depois dos roedores, como a segunda principal fonte de infecção para o homem (Brod *et al.*, 2005). A

importância dos cães como reservatórios se deve ao contato que estes animais têm com seus donos e o fato de coabitar o espaço peridomicilar com roedores. O cão é conhecido reservatório do sorogrupo *Canicola*, como observado em um estudo realizado em São Paulo que mostrou que 50% das infecções observadas em cães errantes eram provocadas pelo sorovar *Canicola* (Yasuda, Santa Rosa e Yanaguita, 1980), identificado também em 91% dos isolados obtidos (Yasuda *et al.*, 1980). Porém o cão pode também albergar leptospiros de outros sorogrupos. Por exemplo, a presença de cães em quintais ou jardins pode aumentar a ocorrência de ratos nestes locais devido ao fato destes roedores serem atraídos pela comida e abrigo disponíveis para os animais domésticos ali residentes (Langton, 2001; Jansen *et al.*, 2005). Cães caçam roedores, ou tem contato com água, alimento ou solo infectados pela urina de roedores, podendo assim o cão carrear leptospiros do sorogrupo *Copenhageni* (Miller *et al.*, 2007), como mostram relatos recentes da predominância deste nos cães avaliados (Thiermann, 1980; Dickeson e Love, 1993; Masculli, 2002; Burriel *et al.*, 2003; Rodriguez *et al.*, 2004; Brod *et al.*, 2005).

Quando o cão tem contato com *Leptospiras* patogênicas ele pode apresentar manifestações clínicas como letargia, depressão, anorexia, vômito, febre, dor muscular, diarreia, mucosas ictéricas, polidipsia e polaciúria. A doença pode evoluir para hepatite e nefrite, até mesmo com evolução fatal. Também pode ser observado quadro subclínico ou ausência de sintomas que podem dificultar a detecção da leptospirose no animal pelo seu dono ou pelo veterinário (Faine *et al.*, 1999; Langston e Heuter, 2003). Nestes casos, muitas vezes o cão é considerado um animal sadio podendo assim contaminar pessoas, animais ou o ambiente ao seu redor (Prescott, 2008), como observado em um estudo com 500 cães, onde 41



destes apresentaram leptospirúria demonstrada por PCR e somente quatro tinham sinais clínicos compatíveis com leptospirose (Harkin *et al.*, 2003). Por algum tempo acreditou-se também na possibilidade da variação na apresentação clínica da leptospirose canina estar relacionada aos diferentes sorogrupos que poderiam estar acometendo os animais, porém essa suspeita não foi confirmada por (Goldstein *et al.*, 2006) e (Geisen *et al.*, 2007).

Vários estudos focaram na prevalência de leptospirose em cães errantes e domiciliados no Brasil e no mundo. Os principais achados em cães errantes foram 37,8% de soropositividade para leptospiras patogênicas em 1980 na cidade de Detroit e 21.6% em São Paulo (Thiermann, 1980; Yasuda *et al.*, 1980), 62% em 1997 em Barbados (Weekes *et al.*, 1997) e 41, 1% em Cali, Colômbia em 2004 (Rodriguez *et al.*, 2004). Em relação a cães domiciliares, Trevejo *et al.* em 1998 pesquisando um surto de leptospirose na Nicarágua detectaram 44,6% de soropositividade nos cães domésticos e relacionaram como a possível causa do surto a contaminação de água pela urina desses animais infectados, em 2002 Vado-solis *et al.* em Yucatan no México e Masculli *et al.* em Santana de Parnaíba no estado de São Paulo encontraram respectivamente 19% e 15% de soropositividade, Lopes *et al.* em 2003 em Botucatu, São Paulo encontraram 17,9% de soropositividade (Trevejo *et al.*, 1998; Masculli, 2002; Vado-Solis *et al.*, 2002).

#### 1.4 Evidências do papel do cão na leptospirose humana

Vários estudos têm demonstrado que a presença de cães no domicílio ou próximo a este representa um fator de risco para leptospirose humana (Douglin *et al.*, 1997; Leal-Castellanos *et al.*, 2003; Jansen *et al.*, 2005). Muitos destes foram observados em áreas rurais, logo as evidências epidemiológicas da importância do cão durante epidemias urbanas de leptospirose ainda não foram elucidadas. Apesar de relatos de estudos em áreas urbanas, inclusive no nosso meio, como um estudo realizado em Salvador, no ano de 1977, onde 21.6% dos cães avaliados durante campanha de vacinação anti-rábica foram soropositivos para leptospirose (Caldas *et al.*, 1977). Em 1979, o mesmo grupo realizou um estudo tipo caso controle com pacientes com leptospirose do Hospital Couto Maia de Salvador e seus cães, tendo considerado o cão como provável fonte de infecção para os casos avaliados (Caldas e Sampaio, 1979). Viegas *et al.* avaliaram soros encaminhados ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UFBA e verificaram 44.3% dos cães testados como reagentes para *Leptospira* (Viegas *et al.*, 2001). Um outro estudo testando cães de rua capturados pelo Centro de Controle de Zoonoses em diferentes bairros de Salvador encontrou 85% de soropositividade contra leptospiras (Viegas, 2001).

Podemos afirmar que os cães são portadores eficientes de leptospiras, mas poucos relatos sugerem a transmissão direta ao homem, em geral está relacionada ao contato do homem com urina de cães infectados (Davis *et al.*, 2008). Dentre estes relatos, em 1963, os cães foram identificados como provável fonte de infecção de um surto identificado no mesmo bairro de um caso de leptospirose humana em São Paulo, que poderia estar sendo causado pelo contato direto com a urina deste animal ou água contaminada das valetas ou córregos ali existentes (Amatoneto *et al.*, 1963), relatos de cinco casos humanos adquiridos de cães

saudáveis vacinados expostos ao solo contaminado com fezes de ratos (Feigin *et al.*, 1973) e de um caso fatal em um tratador de cães que havia mantido contato com um cão infectado em Barbados (Weekes *et al.*, 1997).

Evidências epidemiológicas apontam o cão como provável responsável pela transmissão da leptospirose para humanos, como sete casos de leptospirose humana relatados em Oregon, USA, que ocorreram em casas próximas umas das outras, em uma delas um cão morreu de leptospirose um mês antes do surgimento dos casos humanos, tendo o sorogrupo Autumnalis sido detectado nas pessoas e no cão (Fraser *et al.*, 1973). Outro caso humano resultante da exposição a cães foi observado em um homem infectado por seus cães de onde foram isoladas leptospirosas que aglutinaram com o soro do paciente, sendo que um dos cães havia sido vacinado (Schmidt *et al.*, 1989). Em um surto de leptospirose ocorrido na Nicarágua em 1995, a alta taxa de soroprevalência dos cães, a predominância de isolados do sorovar Canicola, a alta soroprevalência deste mesmo sorovar entre os casos humanos e o maior risco epidemiológico relacionado com a posse de cães com títulos  $\geq 400$  sugerem que a transmissão resultou da exposição direta ou indireta a urina de cães infectados (Trevejo *et al.*, 1998).

Além da possibilidade da participação dos cães na transmissão da leptospirose, os cães têm um grande potencial para contribuir para estudos epidemiológicos relacionados à saúde pública como marcadores ou sentinelas para leptospirosas patogênicas (Ward *et al.*, 2004; Ward, Guptill e Wu, 2004; Ghneim *et al.*, 2007; Davis *et al.*, 2008).

Todas as pesquisas citadas anteriormente basearam-se somente em sorologia com a realização da técnica de microaglutinação (MAT) para o diagnóstico, técnica que apesar de considerada como padrão-ouro apresenta problemas por detectar a presença de IgG e IgM contra leptospiros, não podendo se diferenciar uma infecção prévia de uma recente exceto quando baseia-se em amostras pareadas para observação de soroconversão ou aumento do título (Cumberland *et al.*, 1999; Faine *et al.*, 1999). Além disso, o sorogrupo contra o qual se obteve o maior título pode ser caracterizado como provável infectante, porém esta correlação quando analisada em relação ao isolamento prediz corretamente o sorovar infectante em menos de 50% dos casos (Levett, 2003).

Somente o isolamento de leptospira em cultura permite um diagnóstico definitivo e a correta identificação do sorovar infectante principalmente quando em isolados de urina de animais (Faine *et al.*, 1999). Porém esta técnica é raramente utilizada devido à baixa sensibilidade e o longo tempo necessário para o cultivo (Bharti *et al.*, 2003).

Em relação ao isolamento de leptospiros de cães, Pestana de Castro (1962) isolaram uma cepa do sorogrupo Icterohaemorrhagiae de cães que apresentavam sintomas clínicos em São Paulo (Pestana De Castro, 1962). Também em São Paulo, Yasuda et al. em 1980 isolaram leptospiros de cães de rua dos sorovares Canicola, Copenhageni e Pomona (Yasuda *et al.*, 1980). Em Detroit, USA, Thierman obteve sucesso no isolamento de leptospiros da urina de cães somente após a alcalinização da urina com administração oral de bicarbonato de sódio, desta forma obteve 7 isolados do sorovar Copenhageni de cães que apresentavam altos títulos

no MAT (Thiermann, 1980). Novos sorovares foram isolados tais como o sorovar Bim, de um cão em Barbados (Jones *et al.*, 1984), sorovar Buenos Aires, do sorogrupo Djasiman de um feto canino abortado na Argentina também isolaram um novo (Rossetti *et al.*, 2005) e sorovar Sejroe de cães experimentalmente infectados, demonstrando a capacidade do cão ser portador renal assintomático e eliminar leptospiras em sua urina (Scanziani *et al.*, 1994).

### 1.5 Aplicação de técnicas de epidemiologia molecular para caracterização de isolados caninos

Visto que há possibilidade de transmissão do cão para o homem, torna-se necessária a utilização de técnicas que permitam estabelecer a existência de relação entre isolados de cães e aqueles procedentes de casos humanos. Para que estes objetivos sejam alcançados foram desenvolvidas algumas técnicas moleculares baseadas em análises do DNA, capazes de detectar a existência de correlação entre diferentes isolados.

No presente trabalho, utilizamos a técnica molecular “Variable-Number Tandem-Repeat” (VNTR) previamente validada nos estudos de Majed *et al.* Esta técnica consiste de uma análise dos polimorfismos de VNTRs que permite a identificação de isolados de *Leptospira sp.*, com caracterização molecular rápida e identificação, quando possível, de variações genótípicas entre os sorovares (Majed *et al.*, 2005). VNTR são seqüências repetitivas curtas (cerca de 10 a 100 pb), similares, dispostas em *Tandem*, identificadas na espécie *Leptospira interrogans*, a partir do sequenciamento completo do genoma dos

sorovares Lai e Copenhageni (Ren *et al.*, 2003). O número de cópias em cada locus pode variar de 1 a 14 de um sorovar para outro. O poder da técnica foi confirmado, devido a sua capacidade de identificar variabilidades genéticas decorrentes da heterogeneidade que existe entre os sorovares (Majed *et al.*, 2005). O uso desta técnica pode ser uma importante ferramenta na caracterização molecular de isolados de *Leptospira spp.*, ajudando a identificação de similaridade entre as cepas dos cães e as cepas que vem infectando as pessoas.

Neste trabalho tivemos como objetivo determinar se cães domiciliados contribuem para a transmissão de epidemias de leptospirose urbana, como forma de desenvolvermos argumentos para a utilização de intervenções como medidas de controle, tais como tratamento de cães infectados, vacinação e controle de cães de rua. Tais medidas de controle poderiam ser implementadas em conjunto com algumas que vem sendo utilizadas em algumas áreas como coleta regular de lixo, saneamento básico e controle de roedores, que visam à melhoria das condições de habitação e o controle da transmissão por roedores. Medidas de controle realizadas envolvendo dois reservatórios e não somente os roedores como vem sendo comumente realizado, poderiam otimizar os resultados do controle da leptospirose, reduzindo a transmissão de leptospirose para os homens.

## 2. Justificativa

A história natural da leptospirose nos centros urbanos vem despertando grande interesse devido ao aumento do número de casos observados nestes locais, principalmente nas regiões de comunidades carentes. Essas áreas pobres vêm crescendo com a migração da população rural para as cidades, que não apresentam infra-estrutura adequada para receber os novos habitantes, os quais se instalam principalmente nas periferias. Regiões sem saneamento básico e coleta de lixo, onde os novos moradores se agregam, dão origem às favelas, que vem crescendo acentuadamente a cada ano. Estes locais são caracterizados pela pobreza, desorganização e falta de condições sanitárias adequadas. Condições que favorecem o crescimento da população de roedores, principal reservatório envolvido na transmissão da leptospirose nos grandes centros urbanos.

Além dos roedores, outros animais também encontram-se presentes neste ambiente favelizado, como cães, gatos, galinhas e algumas vezes suínos, caprinos, eqüinos que também podem estar envolvidos na transmissão da leptospirose assim como de outras infecções. Dentre estes animais citados o cão é aquele presente em maior número nestes locais, freqüentemente errantes ou semi domiciliados.

O cão é sabidamente reservatório de leptospiras e quando infectado pode adoecer ou não ter sintomas, entretanto, em ambas as manifestações pode desenvolver a colonização renal e eliminação de leptospiras na urina. Apesar disso, são poucos os relatos de transmissão de leptospirose do cão para o homem, especialmente em áreas urbanas. Desta forma podemos afirmar que o papel dos cães na transmissão da leptospirose urbana ainda carece de pesquisas e deve ser mais bem estudado para que possamos mensurar sua importância na ocorrência de leptospirose nas pessoas próximas a estes animais.

Além disso, após a conclusão dos estudos, se for comprovado que o cão possui um papel na transmissão da leptospirose nas comunidades carentes de Salvador, algumas medidas de controle podem ser implementadas juntamente com efetivo saneamento básico tais como controle dos cães de rua, tratamento dos cães infectados e vacinação, que contribuirão para a redução da transmissão da leptospirose para as pessoas residentes nestas áreas.



### **3. Objetivos**

#### **3.1. Geral**

Determinar se cães domiciliados contribuem para a transmissão de leptospirose urbana.

#### **3.2. Específicos:**

- 1. Avaliação da soroprevalência para evidência de infecção prévia por leptospiras em cães e seus fatores de risco em um estudo de corte transversal em uma área de um estudo de coorte com pessoas em uma comunidade carente com alto risco para leptospirose.**
- 2. Verificar se cães infectados com leptospiras constituem um fator de risco para o desenvolvimento da leptospirose humana.**

## **4. Manuscrito**

### **TÍTULO:**

Domestic Dogs as Reservoirs of Leptospirosis in Urban Slum Setting

[Cães Domésticos como reservatórios da Leptospirose em Favelas Urbanas].

A ser submetido.

## **Domestic Dogs as Reservoirs of Leptospirosis in Urban Slum Setting**

**Running head:** Dogs as reservoirs of urban leptospirosis

Deborah Bittencourt Mothé Fraga, DVM, MS\* Nicolette Zarday, DVM, MS † Fernanda de Souza Santos, DVM \* Rosan Barbosa Matos, BS\* Renato Reis Barbosa, BS\* Ridalva Dias Martins Felzemburgh, MS\* Adriano Queiroz, MS\* Andréia Carvalho Santos, \* Lee Riley, MD† Mitermayer Reis, MD, PhD\* and Albert Icksang Ko, MD\*‡

\* Gonçalo Moniz Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Brazilian Ministry of Health, Salvador, Bahia, Brazil

† School of Public Health, University of California, Berkeley, California, USA

‡ Division of International Medicine and Infectious Diseases, Weill Medical College of Cornell University, New York, New York, USA

**Correspondence to:** Dr. Albert Icksang Ko, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Waldemar Falcão 121, 40296-710, Salvador, Bahia, Brasil; e-mail: [aik2001@med.cornell.edu](mailto:aik2001@med.cornell.edu)

Abstract word count:

Text word count:

## ABSTRACT

**Background:** Pathogenic leptospires are carried by diverse mammals, and dogs are regarded, along with rodents, as a possible source of human infection in the urban environments. The aim of the study was determine whether domestic dogs contribute for the urban transmission of leptospirosis.

**Methods and findings:** A cross-sectional serosurvey was performed from June to October 2005 with domestic dogs and their owners in Pau da Lima community, a slum in the city of Salvador, Brasil. From 61 households, a total of 97 dogs were enrolled and 36 of them were seropositive, resulting in a leptospirosis prevalence of 37%. Risk factors for canine leptospirosis infection were identified to be age  $\geq$  24 months (OR= 5.54; 95%CI= 1.19-25.87), mixed-breed (OR= 5.06; 95% CI= 1.08-23.76) and hunting rats (OR= 3.67; 95% CI= 1.12-12.01). Additional risk factors included reside in the poorest zone (OR=6.1), in a household located  $\leq$  5 meters above lowest point in valley (OR=4.93; 95% CI= 1.55-15.68) and vegetation in proximity of the household (OR= 3.88; 95% CI= 1.04-14.44). The predominant serovar (83%) recognized in MAT was Copenhageni. Two isolates were obtained from canine urine samples and serogrouped as Icterohaemorrhagiae. Canine isolates were compared with clinical strains from a rat and one human case with severe leptospirosis both from Salvador, and all three exhibited the same DNA fingerprinting. Association between owing dogs with evidence of previous infection and human seroprevalence was observed (OR= 2.18; 95% CI= 1.13 – 4.17). As well as with seroconversion in owners of seropositive dogs (OR= 3.22; 95% CI= 1.24 – 8.30).

**Conclusions:** The highly serological evidence of leptospiral infection and sucessful isolation demonstrate that dogs may carry and excrete pathogenic leptospira in the urban endemic area

of the study. Owing seropositive dog was also identified as a risk factor for serologic evidence of human infection in the studied area.

**Keywords:** leptospirosis, dogs, *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni, reservoirs, urban slums, transmission.

## INTRODUCTION

Leptospirosis, a zoonosis of global importance, has emerged to become an urban health problem [1-6]. Uncontrolled urban growth has led to the emergence of slums throughout the developing world [7]. Urban outbreaks of leptospirosis have been documented in these settings each year during seasonal heavy rainfall [3-5, 8-13]. In Brazil, outbreaks have occurred in the urban slums of all major cities during the same periods of heavy seasonal rainfall and flooding [14] resulting in more than 12,000 reported cases of severe leptospirosis [3, 5, 8-12, 14]. Case fatality of typical presentation of severe leptospirosis, Weil's disease (jaundice, renal failure and hemorrhages) is 10-15% [15]. However, for severe pulmonary hemorrhage syndrome it can be as high as 74% [16].

Human leptospirosis is transmitted by direct contact with animal reservoirs or indirectly due to exposure to contaminated water and soil. A large spectrum of mammals may serve as reservoirs for leptospirosis. Pathogenic leptospires are shed in the urine of natural reservoirs and can survive in contaminated water and soil for months to up to years [17-20]. The identification of potential reservoirs is of major importance for the implementation of effective control measures. The rapid uncontrolled urbanization and worsening social inequality in developing countries creates conditions for heavy infestation of peridomestic rodents, favoring transmission of leptospirosis and other human diseases [1, 2, 21-25]. Salvador comprises a metropolitan area with 3.4 million inhabitants and is the third largest city in Brazil. The period from June to August is usually associated with heavy rainfalls and floods. Poor sanitary conditions are the rule as 60% of the 2.6 million inhabitants reside in slum communities defined by the census bureau as favelas (slums) [7]. In Salvador, a

microbiologic survey conducted after the outbreak of 1998 demonstrated that 80.3% of 142 urban rats captured at the vicinity of household from index severe leptospirosis cases had a positive culture isolate from urine or kidney specimens [24]. When comparing 22 human isolates with 5 isolates from urban rats captured in the vicinity of index cases, 21 of 22 (95%) clinical isolates were found to share identical DNA fingerprinting of serovar Copenhageni [26].

Although domestic rats are major reservoirs for urban leptospirosis [1, 2, 23, 24], mice and dogs, which serve as carriers of leptospira [27-32], are also present in urban settings.

In addition to the possible transmission risk associated with direct contact with urine of infected pets, dogs kept in gardens may also increase the likelihood of concomitant rodent infestation, as rodents are attracted by the food and the shelter available for those dogs. [33-36]. Dogs exposed to leptospira may develop severe disease or become asymptomatic carrier. Their kidneys are often colonized by pathogenic leptospira, so even dogs apparently healthy may shed leptospira in their urine [32, 37]. Dogs have already been implicated on some leptospirosis outbreaks in United States and Barbados [32, 38-40]. The close contact between pet animals and their owners can be responsible for the transmission of leptospirosis to humans [17, 37, 41, 42]. Human leptospirosis cases have been related to dogs ownership which has been identified as risk factor for leptospiral infection [34, 39, 43].

In 1995, a leptospirosis outbreak occurred in rural Nicaragua and dogs were postulated as the main source of infection. This suspicion was based on presumptive identification of serovar Canicola infection by microscopic agglutination test on cases sera, confirmed by culture in patients and dogs and the high seroprevalence of antileptospiral agglutinins in dogs [44].



Serological inquiries suggest a role of dogs in the transmission of urban leptospirosis. Dogs were identified as probable infection source of leptospirosis in case control studies in São Paulo [45] and Salvador [46]. High seroprevalence ranging from 35 to 62% and isolates have been obtained in dogs worldwide [29-31, 47-50]. Increasing reports and isolation of Copenhageni in dogs indicate rat to dog transmission [31, 35, 48, 51-53]. The coexistence of free roaming dogs and rat infestation in urban slums may favor a high risk of transmission to owners.

This study was conducted to determine 1) whether dogs in the urban slum environment exhibit serologic evidence of exposure to pathogenic leptospires, 2) whether they are carriers and if so, which are the serovars, 3) evaluate the risk of dogs in transmitting leptospirosis to humans in this setting.

## **METHODS**

### **Study Site**

From June to October 2005 we conducted a cross-sectional serosurvey in the dogs of one of the valleys of the total cohort study area. The area selected for this study with dogs contains flooding areas, severe human cases of leptospirosis, open sewer, and others characteristics that exist in the other Pau da Lima valleys, therefore representing Pau da Lima surroundings. In the selected area for the dog study resides 3,309 of this people in 875 households, although the cohort study has being visiting every year 204 houses with 550 individuals in this dog study area randomly selected. Based on the cohort questionnaires we selected the houses that have dogs to visit, 76 households with 279 subjects.

The study site was located in the Pau da Lima community (Figure 1) which is situated in the periphery of Salvador, Bahia, the third largest city in Brazil, with a population of 2,443,107 inhabitants [12]. Pau da Lima is a slum located in the peri-urban area of Salvador, with a population of 48,641 inhabitants distributed among 9,302 domiciles.

Since 2003, a cohort study of population was initiated in this community to investigate the natural history of urban leptospirosis in an area of 0.46 km<sup>2</sup> comprised of four valleys [12]. The census done in 2003 by the study team established that in the area of the cohort's study in Pau da Lima lives 14,122 persons. Households were assigned sequential numbers. A computer-based random number generator was used to select a list of 1,079 sample households from a database of all enumerated households. Eligible subjects who resided in sample households and had five or more years of age were invited to be a study participant [12].

### **Studied Population**

The dogs inclusion criteria were: to be older than 6 months of age, to have an owner and lives in his house, to allow the blood collection and the owner assign the consent form. 76 domiciles were initially selected, totalizing 107 dogs and 279 subjects. 62 of these domiciles (80%) were included in the study, resulting a total of 198 inhabitants and 97 dogs (90%), due to the exclusion of 1 domicile with a dog of inferior age, 2 refusal domiciles that had 4 dogs, 8 domiciles that did not have dogs anymore and 4 domiciles had 5 dogs excluded due to temperament. The study was reviewed and approved by the Ethics committee for use of Experimental Animals at Fiocruz.

Human subjects includes 550 inhabitants of the study area that are participating of the cohort study, including here 198 cited above that have dog.

### **Collection of Data**

The study consisted of both questionnaire and field survey/laboratory components. Houses were visited and a questionnaire was applied to each owner, to identify all domestic dogs living in the place of the study. The information collected included potential risk factors for leptospirosis infection like animal's sex, race, breed and age, history and presenting clinical signs, origin of the water supplied to the animals, outdoor access, and presence of rodents in the household and other characteristics and environmental issues. Physical exam and questionnaire was performed after the owner signed the agreement term. Presence of compatible clinical signs with leptospirosis or other pathologies was observed in the physical exam. Blood was collected by puncture of the cephalic vein and the urine was collected by cystocentesis after the physical exam.

Serum samples from human subjects were collected during the annual visit independently of having dogs for the cohort study, when study team conducted interviews and administered a questionnaire to obtain information on demographic, socioeconomic and exposure indicators. To evaluate dogs like risk factors for leptospirosis, inhabitants without dogs were compared to dog owners.

### **Laboratorial Analysis**

Serum samples were obtained following centrifugation of clotted blood and were stored at -20°C until analysis. Serum samples were tested for the presence of antileptospiral antibodies using microscopic agglutination test (MAT), following standard procedures. A panel of 20

leptospire serovars of reference strains (WHO Collaborative Laboratory for Leptospirosis, Royal Tropical Institute, Holland) and one local isolate were used as follows: *L. interrogans* serovar Copenhageni strain Fiocruz L1 130, *L. interrogans* serovar Copenhageni strain M20, *L. interrogans* serovar australis, *L. interrogans* serovar autumnalis, *L. interrogans* serovar bataviae, *L. interrogans* serovar canicola, *L. interrogans* serovar pomona, *L. interrogans* serovar pyrogenes, *L. interrogans* serovar wolfii, *L. interrogans* serovar hebdomadis, *L. biflexa* serovar patoc, *L. biflexa* serovar andamana, *L. borgpetersenii* serovar ballum, *L. borgpetersenii* serovar javanica, *L. borgpetersenii* serovar tarassovi, *L. weilii* serovar celledoni, *L. kischineri* serovar cynopteri, *L. kischineri* serovar grippothyphosa, *L. noguchii* serovar panama and *L. noguchii* serovar shermani. Screening was performed with dilutions of 1:25, 1:50 and 1:100. When agglutination was observed at a dilution of 1:100, the sample was titrated to determine the highest agglutination titer. Positive and negative control sera were included in every assay. Serological testing was done blindly to, and independently of questionnaire results.

A single reciprocal titer of 100 or greater was considered seropositive and indicative of exposure to leptospirosis for dogs and persons. If a serum sample agglutinated for more than 1 antigen, it was considered positive to the antigen it reacted to at the highest dilution.

The collected urine was used for culture. Three drops of urine was kept in liquid medium EMJH DIFCO containing 5-fluorouracil in BOD under temperature of 29°C. These medium tubes were being examined weekly in a dark field microscope for sixteen weeks for observation of the presence of bacteria with morphology characteristic of leptospire.

### **Identification of Leptospiral Isolates**

Isolates obtained from collected urine were serogrouped with heterologous serum prepared against the serogroups represented in the serovar battery described above. The serogroup was confirmed by VNTR (Variable-Number Tandem-Repeat PCR), which allowed compare profiles of the leptospiral isolates of the dogs, a rat and a patient isolated during previous investigations in Salvador and WHO reference strains.

### **VNTR PCR Amplification and DNA Extraction**

DNA from 20 ml and 7 day leptospiral culture pellets was purified with Quiagen Kit following manufacture protocol. PCR amplification of the VNTR loci 4, 7 and 10 was carried out in a total Mix volume of 50  $\mu$ l containing 1X PCR buffer, 3.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M dNTP Mix, 10 pmol each of forward and reverse primer, 1 U of recombinant *Taq* polymerase and 1  $\mu$ l of the DNA preparation. Ultra-pure water was added to making up the volume to 50  $\mu$ l, and the PCRs were run on a Mastercycler Gradient. Amplification was achieved using an initial denaturation at 94°C for 5 minutes, followed by 35 cycles of a three step cycle protocol: 94°C for 30 seconds, 55°C for 30 seconds and 72°C for 1 min 30 s and a final extension of 72°C for 10 minutes. The amplified products were analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis. The sizes of the amplified products were estimated by comparison with a 100-bp ladder.

### **Definition of Zones in the Study Area**

The study area was divided into zones using the spatial mapping of poverty distribution in the urban areas of Bahia carried out by SECOMP, Secretaria de Combate a Pobreza e as Desigualdades Sociais [54]. With the National demographic census database of 2000 (IBGE) was done geographic localization of demographic and socioeconomic data, education and

access to basic social services, identifying relations and concentration of social inequality in the geographic space. They considered domicile characteristics like situation, kind, number of subjects, bathroom number with and without toilets, types of water supply, existence of pipe for water and drainage, type of sewage system, waste destination and people characteristics like age, household responsible and household responsible characteristics (years of study, household per capita monthly income). The study area was divided in three different zones based on the classification above. Zone 1, 2 and 3 presented the highest, the medium and the lowest poverty level in the studied area respectively.

### **Statistical analysis**

Epi Info for Windows (version 3.3.2) software (CDC, Atlanta, GA) was used for double-enter and validate epidemiological and laboratory data. Data for individual subjects was linked by location of residence to spatially-coded information for households and environmental attributes within the study site. As previously described, digital model of topographic data was used (ArcGIS 3D Analyst Extension) (version 8.3) to obtain continuous estimates of altitude for the study area, and of the distance from the households to nearest open drainage systems and refuse deposits [12]. Distances were calculated in three-dimensional space based on coordinates obtained from the digital model. Elevation of households with respect to the lowest point in the valley which they were situated was used as an indicator for flood risk.

Generalized additive models (GAM) were used to determine the presence of a linear correlation between continuous variables and the function for infection risk. Age and meters above the lowest point in valley did not present a linear correlation with the function for

infection risk, then were categorized according to the x-intercept value in fitted smoothed function plots for evaluation in the regression models.

Seroprevalence was calculated by dividing the number of positive dogs for MAT by the total number of dogs tested. Previous infection for humans or dogs was determined by MAT titers  $\geq 1:100$ . For all of the 550 inhabitants we done MAT on sera samples from the previous collection during november 2004- february 2005 and the next one november 2005- january 2006. A seroconversion was defined as a 4-fold rise or greater in titer between paired samples or a soroconversion (0 to  $\geq 1:100$ ) in the microscopic agglutination test (MAT).

Analysis of variance and the chi-square test were used to compare means and proportions, respectively. A P value  $\leq 0.05$  in two sided testing was used as criteria for a statistically significant difference. The association of risk factors with the MAT positive result was assessed by univariate analyses. The  $X^2$  test was used to determine whether individual or household factors were associated with seropositivity and calculate if the owners of seropositive dogs were more likely to have seropositivity or seroconversion themselves when compared with subjects from houses without dogs. We evaluated differences in seropositive and seronegative dogs and inhabitants in relation to exposure to demographic and environmental risk factors using chi-square tests and computing odds ratio (OR) with 95% confidence intervals (95% CI) and P-values.

Multivariate analyses included univariate factors with a potentially significant association, with  $p \leq 0.10$ . The R version 2.4.1 statistical package (R Foundation for Statistical Computing) was used to obtain model that grouped these variables. A backward elimination

strategy was performed for each variable and the factors were kept in the subsequent models, or only a subset of them, if they reached a p value  $\leq 0.10$ ). The same was then repeated with the identified variables to get the final model.

## RESULTS

From the 76 domiciles initially selected, 107 dogs, 62 of these domiciles (80%) were included in the study, resulting a total of 97 dogs (90%) enrolled. The causes of exclusion were: 1 domicile with a dog of inferior age, 2 domiciles that had 4 refusals, 8 domiciles that did not have dogs anymore and 4 domiciles which had 5 dogs excluded due to temperament. From the total of 97 dogs included in the present study, 50 (51.5 %) were males and 47 (48.5 %) were females; 81 (83.5 %) were mixed-breed dogs and 16 (16.5 %) purebred dogs; 41 (42 %) remain exclusively in household environment and 56 (58 %) were allowed by their owners to stay free outside the home. In regard to vaccination, 84 (86%) of the dogs were vaccinated against rabies and 6 (6%) were vaccinated against leptospirosis. Eleven (11 %) dogs were  $\leq 1$  year old, 38 (39 %) between 1 and 4 years, 21 (22 %) were  $> 4$  years. Twenty-seven (28%) of the dogs their owners were not able to inform the exact age, but reported they were over 1 year old. Figure 1 shows the distribution of dogs in the study area, 30 (31%) dogs lives in zone 1, 48 (49%) in zone 2 and 19 (20%) in zone 3.

Seroprevalence results for leptospiral serovars of tested dogs are shown in Figure 2. Of a total of 97 samples tested, 36 were seropositive, as defined by a MAT titer  $\geq 100$ , resulting in a prevalence of 37%. The predominant predictive infecting serogroup at MAT was *Icterohaemorrhagiae*. In seropositive dogs, predominant titers were directed against serovars



Copenhageni in 30 (83%) cases, Canicola, Ballum and Autumnalis in one each. For the three cases (8%) who had highest titres against two or more serovars, agglutination reactions recognized Copenhageni as one of the serovars. Serogroups Australis, Bataviae, Pomona, Pyrogenes, Wolffi, Tarassovi, Celledoni and Shermani were uncommon as predominant serogroup or as mixed reactor. When a cut off of 1:50 was used, the prevalence rate changed to 58% and with 1:25, prevalence was 67%, however increasing the sensitivity of the survey by reducing the cut-off would create the possibility of interference from cross reactions more likely (fig.2), thereby reducing the overall specificity of the results. For that reason, we maintained the cut off as 1:100, which was most appropriate.

In regard to urine cultures, 33 (34%) of the 97 dogs had urine samples collected. Two out of 33 (6%) of the attempts of isolation in culture medium yielded leptospiral isolates. One of them presented ocular mucosa lightly icteric and anorexia and the other did not exhibit clinical symptoms suggestive of leptospirosis. MAT performed on the blood samples of dogs in which isolates were obtained gave titers of 1:1600 and 1:400 against serovar Copenhageni. Isolates were identified up to serogroup level by microscopic agglutination using heterologue rabbit hyperimmune sera against strains of 18 serogroups. Serogrouping of leptospires isolated confirmed the MAT findings of Icterohaemorrhagiae as the predominant serogroup identified. VNTR analysis were used to compare the two strains isolated from dogs, with the clinical strains identified as serovar Copenhageni recovered from rats at endemic site in Salvador (R1-60) and a patient in Salvador (Figure 3). The result demonstrates that all isolates strains were within the same profiles, and that all of them were different from WHO strain belonging to serovar Canicola.

Table 1 shows the risk factors for serologic evidence of leptospiral infection in dogs. Univariate analysis of the variables indicated age  $\geq$  24 months (OR= 5.54; 95%CI= 1.19-25.87), mixed-breed (OR= 5.06; 95% CI= 1.08-23.76) and the dog's behavior of hunting rats (OR= 3.67; 95% CI= 1.12-12.01) as risk factors for positive MAT samples. Dogs had 6.1 higher risk if they resided in poverty zone 1 than zone 2 (OR= 2.9) and zone 3 (OR=1). Household located  $\leq$  5 meters above lowest point in valley had higher risk than the other ones (OR=4.93; 95% CI= 1.55-15.68). Vegetation  $\leq$  10 meters of the house were dog resides was associated with increase in the risk of *Leptospira* infection in dogs (OR= 3.88; 95% CI= 1.04-14.44). These two characteristics are more likely to be observed in zone 1 houses, the poorest zone where 16 (44%) seropositive dogs were detected than in the other two zones (fig.1). Other household characteristics did not show association with dog risk for leptospirosis.

Receiving potable water from the owner was associated with protection factor for leptospirosis (OR= 0.10; 95% CI= 0.01-0.92). Gender, vaccination status, historical clinical data, presence of other domestic animals like cats or chicken in the house, flood inside the house or in the house's street during rainfall, presence of rats and accumulated material near the house were not significantly associated with previous *Leptospira* infection determined by MAT.

Significant clinical signals of leptospirosis were not found in the physical exam of the dogs included in the study. Not even in dogs that leptospiras were isolated from their urine. One of them showed a mild icteric ocular mucosa, but healthy status was good and this find was not interpreted like a leptospirosis signal.

Multivariate analyses found that the risk for seropositivity was associated with age and household localization. Dogs that were  $\geq 24$  months of age had a 18.57 times (95% CI 2.68-128.64) increased risk for leptospiral seropositivity than younger ones. Dogs living in poverty zone 1 was associated with a 8.48 times (95% CI 1.87-38.51) increased risk than living in the other two zones and if household was located  $\leq 5$ m above lowest point in valley the risk was 10.62 times higher (95% CI 2.42-46.64) (Table 1).

In regard to association between seropositive dogs and infected people inside the same house (table 2), owners of seropositive dogs were more likely to have been exposed to *Leptospira* themselves (OR= 2.18; 95% CI= 1.13 – 4.17) than inhabitants without dogs or owners of seronegative animals. Moreover, the same relation was seen about seroconversion (table 3). Subjects living in the same house of seropositive dogs have increased risk to present seroconversion (OR= 3.22; 95%CI= 1.24 – 8.30). Twenty five (4.8%) of the people tested presented seroconversion from the first to the second year.

The predominant predictive infecting serogroup for humans at MAT was Icterohaemorrhagiae, such as in relation to seroconversion. In these cases, seroconversion was detected against serovars Copenhageni in 21 (84%) cases, Canicola in 3 (12%) and Grippothyphosa in one (4%). Icterohaemorrhagiae was detected as the presumptive infecting serogroup both for dogs or humans.

In the houses where leptospiras were isolated from dog urine, 3 of 7 (43 %)10 subjects presented anti leptospiral agglutinins. The presumptive serogroup was Icterohaemorrhagiae either, the same one identified as the isolates.

## DISCUSSION

This study was performed in an endemic region for urban leptospirosis and identified a 37% canine seroprevalence of antileptospiral agglutination antibodies. This frequency in addition to the predominance of Icterohaemorrhagiae as the most common predicted infecting serogroup among dogs indicates a dynamic circulation of leptospires between dogs, rats and environment. This is reinforced by the two isolates from dogs, serogrouped as Icterohaemorrhagiae. Dogs isolates were compared with clinical strains from a rat and one human case with severe leptospirosis both from Salvador, all of them demonstrate the same genomic profile. A positive association between canine seroprevalence and owners of seropositive dogs seroprevalence was observed (OR= 2.18; 95% CI= 1.13 – 4.17).

Similar seroprevalence in urban settings was reported in stray dogs varying from 37.8% in Detroit [48]; 38.5% [55] and 35% both in Mexico [50] to 41% in Cali [31]. Inferior [29, 56, 57] and superior [47, 49, 58, 59] prevalence rates were reported. These differences in seropositivity could be explained by a variety of factors that influence the transmission of leptospires, such as topography, temperature, region, humidity, precipitation, wildlife reservoirs, domestic reservoirs and others ambient factors [60]. Furthermore, estimates of the prevalence of leptospirosis from surveys of dog populations are difficult to compare because of different MAT cutoff titers, serovars that are included in the MAT, and study design variations.

Our study provides additional evidence of leptospiral transmission in canine population from slum areas. In a poor neighborhood of Buenos Aires, 57% of the studied dogs were seropositive. They reported low frequency of clinical signs [47].

Although dogs are known to be persistent renal carriers of serovar canicola, the duration of shedding of other serovars has not been determined [41]. Dogs can be asymptomatic and may still be shedding leptospires into the environment, thereby increasing the likelihood of humans and other animals' exposure.

Our data are consistent with the idea that rats are the main host, and are responsible for dog infection based on predominance of serogroup Icterohaemorrhagiae. Dogs could contribute for dissemination of leptospirosis due to their intimate contact with their owners, as shown by risk factor.

Age and mixed breed were significantly associated with leptospiral antibody level in dogs from our study. These results are in accordance to previous observations by others [47, 53, 56, 57, 61-65]. Age  $\geq$  24 months increases risk for leptospirosis in dogs probably because older dogs have more time and chance of exposition than youngest ones [66]. Dogs with access to street probably have higher exposure to leptospires. In Pau da Lima, dogs are often seen roaming (58%) and this is a serious threat for the public health. Our results confirm another study conducted in Salvador, where most of the positive dogs were from 12 to 48 months and belonged to an undefined race [56].

Identification of environmental risk factors for leptospirosis allows better recommendation to be given to dog owners at risk of exposure. Efforts to reduce exposure of dogs might have important public-health benefits by reducing exposure of pet-owners to common sources of leptospires [67]. In our study, the areas with poorest conditions concerning poor sanitation and irregular periods of disposal collecting presented the highest frequency of positive reagents for antileptospiral agglutinins, in accordance to previous studies on humans from Salvador [12, 56].

The higher seropositivity and seroconversion rates among owners of seropositive dogs indicates an increased risk of leptospiral infection when compared to other slum inhabitants. Since 1916, Krumblein and Freiling, apud [56], incriminated the dog as a probable transmitter of leptospirosis, showing that two men contracted the illness, after contact with an icteric dog. An epidemiological study with human patients from the Infectious Disease Hospital, Salvador, in 1979 concluded that dog was the probable source of human infection [46]. Epidemiological studies have also demonstrated that keeping dogs is a significant risk for acquiring leptospirosis [34, 43]. Although pet dogs may act as reservoirs, possibly infecting humans they also can act only as warning sentinel or marker for human exposure to leptospirosis, because they share the human environment.

As with other cross-sectional epidemiologic studies, there are limitations to the conclusions that can be drawn from our study. The assessment of exposure was qualitative and was based on historical evidence by dog's owners. Also, it is possible that higher levels of exposure in the past may be no longer detectable at the time of our study. Besides, a single serological MAT does not give precise information about the time of infection.

Finally, the study assessed the public health risk posed to owners of dogs infected with leptospire that cannot be over-emphasized considering the zoonotic nature of the disease. Present data encourages prevention and treatment of these animals in order to reduce the risk of human infection. Companion dogs should be kept in doors, improving hygiene, and canine vaccination should be expanded. In our study, almost all dogs (88.6%) received anti-rabies vaccine, but only 6 dogs (6.1%) were vaccinated against leptospirosis. This low immunization rate is due to the high cost of the vaccine in relation to the economical situation of their owners. Thus, although most of the dogs are vaccinated worldwide, in poor communities, vaccination against leptospirosis is uncommon. The results of this study can be used to provide recommendations for dog vaccination against leptospirosis in high risk areas.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by the Brazilian National Research Council (grant 554788/2006), the Research Support Foundation for the State of Bahia and the National Institutes of Health (grants R01 AI052473 and D43 TW00919).

## **CONFLICT OF INTEREST**

We declare that none of the authors have any potential conflict of interest.



### **FIRST AUTHOR'S BIOGRAPHICAL SKETCH**

Dr. Deborah B. M. Fraga is a veterinarian and researcher at the Oswaldo Cruz Foundation, Brazilian Ministry of Health in Salvador, Brazil, whose research interests focus on zoonotic problems that affect human populations.

## REFERENCES

1. Pereira, M.M. and J. Andrade, *Epidemiological aspects of leptospirosis in a slum area in the city of Rio de Janeiro, Brazil. Search for leptospire and specific antibodies in rodents*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1988. **82**(5): p. 768-70.
2. Pereira, M.M. and J. Andrade, *Human leptospirosis in a slum area in the city of Rio de Janeiro, Brazil--a serological and epidemiological study*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1990. **85**(1): p. 47-52.
3. Ko, A.I., et al., *Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group*. Lancet, 1999. **354**(9181): p. 820-5.
4. Sarkar, U., et al., *Population-based case-control investigation of risk factors for leptospirosis during an urban epidemic*. Am J Trop Med Hyg, 2002. **66**(5): p. 605-10.
5. Romero, E.C., C.C. Bernardo, and P.H. Yasuda, *Human leptospirosis: a twenty-nine-year serological study in Sao Paulo, Brazil*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2003. **45**(5): p. 245-8.
6. Tassinari, W.S., et al., *Detection and modelling of case clusters for urban leptospirosis*. Trop Med Int Health, 2008.
7. Riley, L.W., et al., *Slum health: diseases of neglected populations*. BMC Int. Health Hum. Rights, 2007. **7**: p. 2.
8. McBride, A.J., et al., *Leptospirosis*. Curr Opin Infect Dis, 2005. **18**(5): p. 376-86.
9. Barcellos, C. and P. Chagastelles Sabroza, *Socio-environmental determinants of the leptospirosis outbreak of 1996 in western Rio de Janeiro: a geographical approach*. Int J Environ Health Res, 2000. **10**(4): p. 301-13.
10. Kupek, E., M.C. de Sousa Santos Faversani, and J.M. de Souza Philippi, *The relationship between rainfall and human leptospirosis in Florianopolis, Brazil, 1991-1996*. Braz J Infect Dis, 2000. **4**(3): p. 131-4.

11. Tassinari Wde, S., et al., [*Spatial distribution of leptospirosis in the city of Rio de Janeiro, Brazil, 1996-1999*]. *Cad Saude Publica*, 2004. **20**(6): p. 1721-9.
12. Reis, R.B., et al., *Impact of environment and social gradient on leptospira infection in urban slums*. *PLoS Negl Trop Dis*, 2008. **2**(4): p. e228.
13. LaRocque, R.C., et al., *Leptospirosis during dengue outbreak, Bangladesh*. *Emerg Infect Dis*, 2005. **11**(5): p. 766-9.
14. Health Surveillance Secretary, B.M.o.H., *Leptospirosis case confirmation records, Brazil*. 2008.
15. Merien, F. and P. Perolat, *Public health importance of human leptospirosis in the South Pacific: a five-year study in New Caledonia*. *Am J Trop Med Hyg*, 1996. **55**(2): p. 174-8.
16. Gouveia, E.L., et al., *Leptospirosis-associated Severe Pulmonary Hemorrhagic Syndrome, Salvador, Brazil*. *Emerg Infect Dis*, 2008. **14**(3): p. 505-508.
17. Faine, S.B., et al., *Leptospira and leptospirosis*. 2nd ed. 1999, Melbourne, Australia: MediSci.
18. Levett, P.N., *Leptospirosis*. *Clin Microbiol Rev*, 2001. **14**(2): p. 296-326.
19. Bharti, A.R., et al., *Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance*. *Lancet Infect Dis*, 2003. **3**(12): p. 757-71.
20. Ganoza, C.A., et al., *Determining Risk for Severe Leptospirosis by Molecular Analysis of Environmental Surface Waters for Pathogenic Leptospira*. *PLoS Med*, 2006. **3**(8), p. 1229-1240.
21. Thiermann, A.B., *Incidence of leptospirosis in the detroit rat population*. *Am J Trop Med Hyg*, 1977. **26**(5 Pt 1): p. 970-4.
22. Sakata, E.E., et al., [*The serovars of Leptospira interrogans isolated from cases of human leptospirosis in Sao Paulo, Brazil*]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 1992. **34**(3): p. 217-21.
23. Vinetz, J.M., et al., *Sporadic urban leptospirosis*. *Ann Intern Med*, 1996. **125**(10): p. 794-8.
24. Faria, M.T., et al., *Carriage of Leptospira interrogans among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil*. *Acta Trop*, 2008.

25. Sunbul, M., et al., *Rattus norvegicus acting as reservoir of leptospira interrogans in the Middle Black Sea region of Turkey, as evidenced by PCR and presence of serum antibodies to Leptospira strain*. Scand J Infect Dis, 2001. **33**(12): p. 896-8.
26. Barocchi, M.A., et al., *Identification of new repetitive element in Leptospira interrogans serovar copenhageni and its application to PCR-based differentiation of Leptospira serogroups*. J Clin Microbiol, 2001. **39**(1): p. 191-195.
27. Collares-Pereira, M., et al., *Rodents and Leptospira transmission risk in Terceira island (Azores)*. Eur J Epidemiol, 2000. **16**(12): p. 1151-7.
28. Matthias, M.A. and P.N. Levett, *Leptospiral carriage by mice and mongooses on the island of Barbados*. West Indian Med J, 2002. **51**(1): p. 10-3.
29. Yasuda, P.H., C.A. Santa Rosa, and R.M. Yanaguita, *[Seasonal variation in the prevalence of leptospirosis in stray dogs in Sao Paulo, Brazil]*. Rev Saude Publica, 1980. **14**(4): p. 589-96.
30. Yasuda, P.H., et al., *The isolation of leptospires from stray dogs in the city of Sao Paulo, Brazil*. Int J Zoonoses, 1980. **7**(2): p. 131-4.
31. Rodriguez, A.L., et al., *[Exposure to Leptospira in stray dogs in the city of Cali]*. Biomedica, 2004. **24**(3): p. 291-5.
32. Feigin, R.D., et al., *Human leptospirosis from immunized dogs*. Ann Intern Med, 1973. **79**(6): p. 777-85.
33. Langton SD, C.D., Meyer AN. , *The occurrence of commensal rodents in dwellings as revealed by the 1996 English House Condition Survey*. . J App Ecol. , 2001. **38**: p. 699-709.
34. Jansen, A., et al., *Leptospirosis in Germany, 1962-2003*. Emerg Infect Dis, 2005. **11**(7): p. 1048-54.
35. Brod, C.S., et al., *[Evidence of dog as a reservoir for human leptospirosis: a serovar isolation, molecular characterization and its use in a serological survey]*. Rev Soc Bras Med Trop, 2005. **38**(4): p. 294-300.

36. Miller, R.I., et al., *Clinical and epidemiological features of canine leptospirosis in North Queensland*. Aust Vet J, 2007. **85**(1-2): p. 13-9.
37. Harkin, K.R., et al., *Comparison of polymerase chain reaction assay, bacteriologic culture, and serologic testing in assessment of prevalence of urinary shedding of leptospires in dogs*. J Am Vet Med Assoc, 2003. **222**(9): p. 1230-3.
38. Barkin, R.M. and J.W. Glosser, *Leptospirosis--an epidemic in children*. Am J Epidemiol, 1973. **98**(3): p. 184-91.
39. Fraser, D.W., et al., *Leptospirosis caused by serotype Fort-Bragg. A suburban outbreak*. Ann Intern Med, 1973. **79**(6): p. 786-9.
40. Weekes, C.C., C.O.R. Everard, and P.N. Levett, *Seroepidemiology of canine leptospirosis on the island of Barbados*. Veterinary Microbiology, 1997. **57**(2-3): p. 215-222.
41. Langston, C.E. and K.J. Heuter, *Leptospirosis. A re-emerging zoonotic disease*. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 2003. **33**(4): p. 791-807.
42. Prescott, J., *Canine leptospirosis in Canada: a veterinarian's perspective*. Cmaj, 2008. **178**(4): p. 397-8.
43. Douglin, C.P., et al., *Risk factors for severe leptospirosis in the parish of St. Andrew, Barbados [letter]*. Emerg Infect Dis, 1997. **3**(1): p. 78-80.
44. Trevejo, R.T., et al., *Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua, 1995*. Journal of Infectious Diseases, 1998. **178**(5): p. 1457-1463.
45. Amatoneto, V., et al., *[Leptospirosis Canicola: Verification of an Outbreak Occurring in a Locality Very Close to S Ao Paulo (Capital)]*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 1963. **10**: p. 265-70.
46. Caldas, E.M. and M.B. Sampaio, *Leptospirosis in the city of Salvador, Bahia, Brazil: a case-control seroepidemiologic study*. Int J Zoonoses, 1979. **6**(2): p. 85-96.
47. Rubel, D., et al., *[Leptospira interrogans in a canine population of Greater Buenos Aires: variables associated with seropositivity]*. Rev Panam Salud Publica, 1997. **2**(2): p. 102-5.

48. Thiermann, A.B., *Canine leptospirosis in Detroit*. Am J Vet Res, 1980. **41**(10): p. 1659-61.
49. Weekes, C.C., C.O. Everard, and P.N. Levett, *Seroepidemiology of canine leptospirosis on the island of Barbados*. Vet Microbiol, 1997. **57**(2-3): p. 215-22.
50. Jimenez-Coello, M., et al., *Serological survey of canine leptospirosis in the tropics of Yucatan Mexico using two different tests*. Acta Trop, 106 (1), p. 22-26, 2008.
51. Dickeson, D. and D.N. Love, *A serological survey of dogs, cats and horses in south-eastern Australia for leptospiral antibodies*. Australian Veterinary Journal, 1993. **70**(10): p. 389-390.
52. Burriel, A.R., C. Dalley, and M.J. Woodward, *Prevalence of leptospira species among farmed and domestic animals in Greece*. Vet Rec, 2003. **153**(5): p. 146-8.
53. Mascoll, R.P., S. R.; Vasconcellos, S. A.; Ferreira, F.; Morais, Z. M.; Pinto, C. O.; Sucupira, M. C. A.; Dias, R. A.; Miraglia, F.; Cortez, A.; Silveira da Costa, S.; Tabata, R.; Marcondes, A. G. , *Inquérito sorológico para leptospirose em cães do município de Santana de Parnaíba, São Paulo, utilizando a campanha de vacinação anti-rábica do ano de 1999*. . Arq. Inst. Biol., 2002. **69**(2): p. 25-32.
54. SECOMP, S.D.C.A.P.E.A.D.S.-. *Mapeamento da pobreza em áreas urbanas do estado da Bahia*. . 2005: Salvador.
55. Rivera Flores, A., et al., *Leptospirosis seroprevalence in stray dogs from northern Mexico City*. Veterinaria - Mexico, 1999. **30**(1): p. 105-108.
56. Caldas, E.M., J.D. Doria, and M.A. Martins, *Immunological inquiry for the epidemiology of leptospirosis in Canis familiaris in Salvador, Bahia, Brazil*. Int J Zoonoses, 1977. **4**(2): p. 103-10.
57. Modolo, J.R., et al., *Seroprevalence of leptospira interrogans serovar djasiman in quarantined pigs*. Indian Veterinary Journal, 2000. **77**(2): p. 155-156.
58. Viegas, S.A.R.d.A.T., C. H. T.; Oliveira, E. M. de D.; Dias, A. R.; Mendonça, F. F.; Santos, M. de F. P., *Investigação sorológica para leptospirose em cães errantes na cidade de Salvador - Bahia*. Rev. Bras. Saúde Prod. An., 2001. **2**(1): p. 21 - 30.

59. Aslantas, O., et al., *Seroepidemiology of leptospirosis, toxoplasmosis, and leishmaniosis among dogs in Ankara, Turkey*. Vet Parasitol, 2005. **129**(3-4): p. 187-91.
60. Alves, C.J.A., J. S. L.; Vasconcellos, S. A. et al. , *Avaliação dos níveis de aglutininas anti-Leptospira em cães no município de Patos - PB, Brasil*. . Rev. Bras. Cienc. Vet., 2000. **7**: p. 17-21.
61. Ward, M.P., et al., *Serovar-specific prevalence and risk factors for leptospirosis among dogs: 90 cases (1997-2002)*. J Am Vet Med Assoc, 2004. **224**(12): p. 1958-63.
62. Ghneim, G.S., et al., *Use of a case-control study and geographic information systems to determine environmental and demographic risk factors for canine leptospirosis*. Vet Res, 2007. **38**(1): p. 37-50.
63. Querino, A.M.V.D., A. C. B.; Oliveira, R. C.; Silva, F. G., Muller, E. E.; Freire, R. L.; Freitas, J. C. , *Fatores de risco associados à leptospirose em cães do município de Londrina-PR*. . Semina: Ciências Agrárias, 2003. **24**(1): p. 27-34.
64. Meeyam, T., et al., *Seroprevalence and risk factors associated with leptospirosis in dogs*. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2006. **37**(1): p. 148-53.
65. Ward, M.P., *Seasonality of canine leptospirosis in the United States and Canada and its association with rainfall*. Prev Vet Med, 2002. **56**(3): p. 203-13.
66. Ward, M.P., L.F. Guptill, and C.C. Wu, *Evaluation of environmental risk factors for leptospirosis in dogs: 36 cases (1997-2002)*. J Am Vet Med Assoc, 2004. **225**(1): p. 72-7.
67. Ward, M.P., L.T. Glickman, and L.F. Guptill, *Prevalence of and risk factors for leptospirosis among dogs in the United States and Canada: 677 Cases (1970-1998)*. Journal of the American Veterinary Medical Association, 2002. **220**(1): p. 53-58.

**Table 1.** Risk factors for *Leptospira* antibodies among 97 dogs from a slum community in Salvador, Brazil.\*

Characteristics	Seropositive <sup>†</sup>	Seronegative	OR (95% CI)	
	N=36	N=61	Unadjusted	Adjusted
	No. (%)			
Age $\geq$ 24 months <sup>‡</sup>	34 (94)	46 (75)	5.54 (1.19-25.87)	18.57 (2.68-128.64)
Mixed breed	34 (94)	47 (77)	5.06 (1.08-23.76)	
<b>Risk behavior</b>				
Drinks potable water	31 (86)	60 (98)	0.10 (0.01-0.92)	
Access to the street	25 (69)	31 (51)	2.20 (0.92-5.24)	
Hunts rats <sup>§</sup>	9 (25)	5 (8)	3.73 (1.14-12.22)	
<b>Household of dog owners</b>				
Per capita income	18 (50)	21 (34)	1.90 (0.82-4.41)	
$\leq$ US\$1/day <sup>¶</sup>				
Poverty Zone**				
1	16 (44)	14 (23)	6.1 (1.26-33.28)	8.48 (1.87-38.51)
2	17 (47)	31 (51)	2.9 (0.66-14.75)	1.67 (0.38-7.30)
3	3 (8)	16 (26)	1.0	1.0
$\leq$ 5m above lowest point	11 (30)	5 (8)	4.93 (1.55-15.68)	10.62 (2.42-46.64)
in valley				
Rat burrows	15 (42)	15 (25)	2.19 (0.91-5.29)	
Vegetation	33 (92)	45 (74)	3.91 (1.05-14.53)	

\* CI, confidence interval; MAT, microagglutination test; OR, odds ratio.

<sup>†</sup> Defined as having MAT reciprocal titer  $\geq$  100.



‡ Owners were not able to inform the age for 26 (27%) dogs. Based on an experienced veterinary evaluation all of them were adults.

§ Owners related that dogs usually hunts rats  $\geq 1$  time a month

¶ Values in dollars were calculated based on the current conversion rate of 1 dollar to 2.2 reais

\*\* Defined using spatial mapping of poverty distribution in the urban areas of Bahia carried out by the State of Bahia.

**Table 2.** Risk for *Leptospira* antibodies among slum residents which reside in households with dogs with and without serological evidence for a prior *Leptospira* infection\*.

Household with	Seropositive subjects <sup>†</sup>	Seronegative subjects	OR (95% CI)
	(N=59)	(N=491)	
	No. (%)		
Dog	24 (41)	174 (35)	1.25 (0.69-2.24)
Seropositive dog	19 (32)	79 (16)	2.18 (1.13-4.17)
Seronegative dog	5 (9)	95 (19)	0.48 (0.16-1.32)
No dog	35 (59)	317 (65)	1.0

\* MAT, microagglutination test; OR, odds ratio; CI, confidence interval.

<sup>†</sup> Definition criteria for seropositivity reaction was defined as MAT reciprocal titer  $\geq$  1:100

**Table 3.** Risk for seroconversion among slum residents which reside in households with dogs with and without serological evidence for a prior *Leptospira* infection\*.

<b>Household with</b>	Subjects with seroconversion <sup>†</sup> (N=25)	Subjects with no seroconversion <sup>†</sup> (N=525)	OR (95% CI)
	No. (%)		
Dog	13 (52)	185 (35)	1.99 (0.83-4.77)
Seropositive dog	10 (40)	88 (17)	3.22 (1.24-8.30)
Seronegative dog	3 (12)	97 (18)	0.88 (0.19-3.42)
No dog	12 (48)	340 (65)	1.0

\* MAT, microagglutination test; OR, odds ratio; CI, confidence interval.

<sup>†</sup> Definition criteria for seroconversion reaction was defined as a 4-fold rise or greater in titer between paired samples or a seroconversion (0 to  $\geq 1:50$ ) in the microscopic agglutination test (MAT).

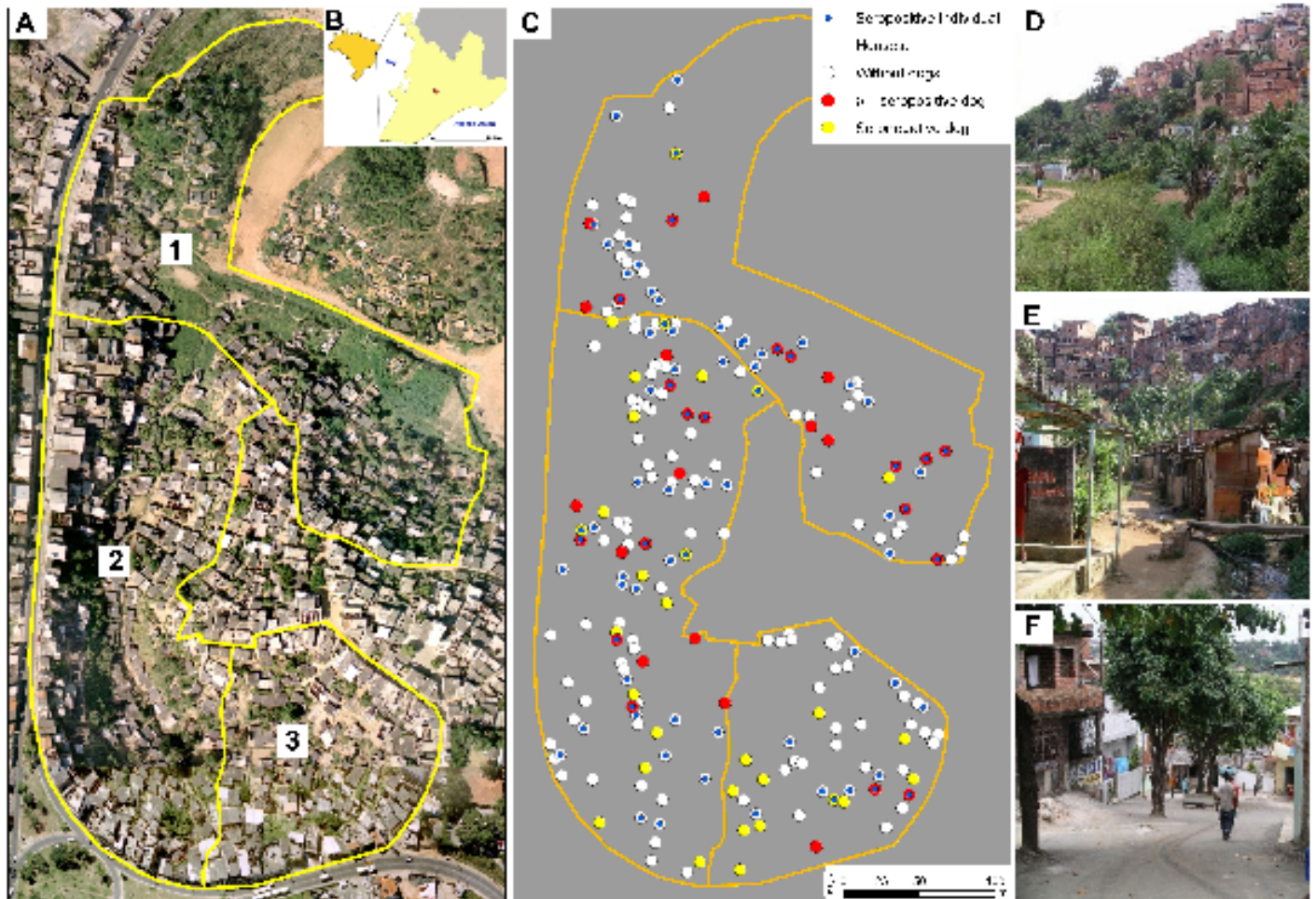
## FIGURE LEGENDS

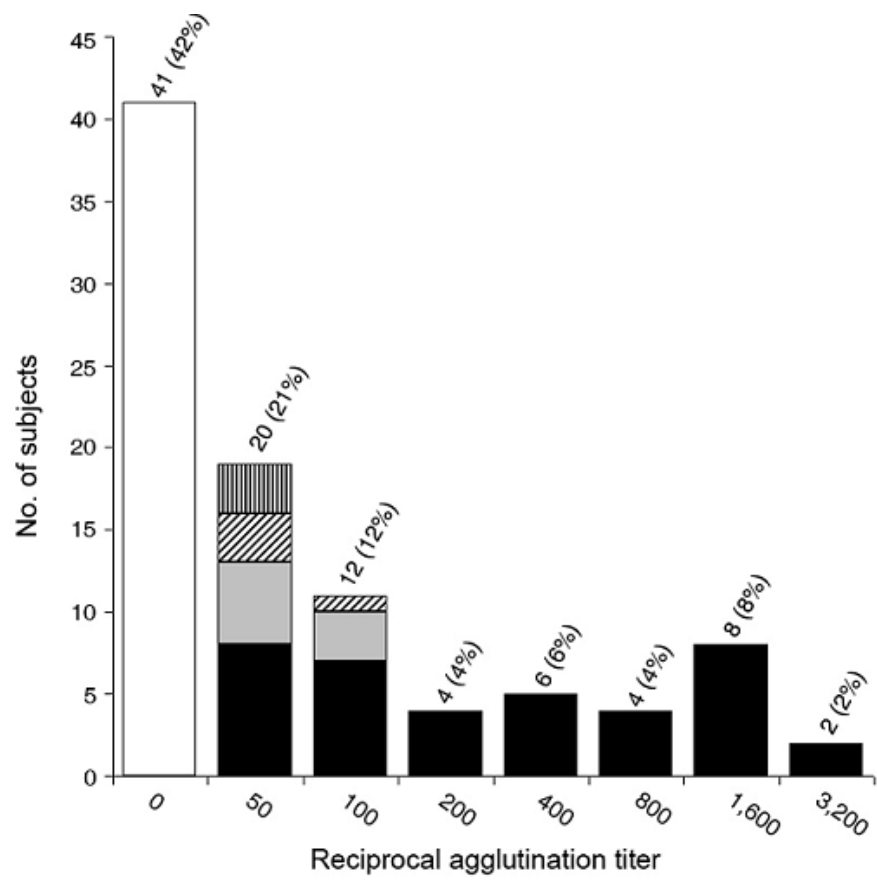
**Fig. 1.** (A) Map of the study area divided into three zones: zone 1- highest poverty level area, 2 - medium poverty level area and 3 - lowest poverty level. The yellow line in the aerial photograph is the boundary of the poverty zones in the study site. (B) Location of Salvador in Brazil and the study area (red) in Salvador. (C) Map of the study area divided into three zones with houses included in the study represented, the white dots are the houses without dogs, red dots are houses with  $\geq 1$  seropositive dog and the yellow ones are houses with seronegative dogs. The blue dots marks the houses where there are at least one seropositive individual. The orange line is the boundary of the poverty zones in the study site. (D), (E) and (F) Photographs of typical environment at the community study site, which represents poverty zones 1, 2 and 3 respectively.

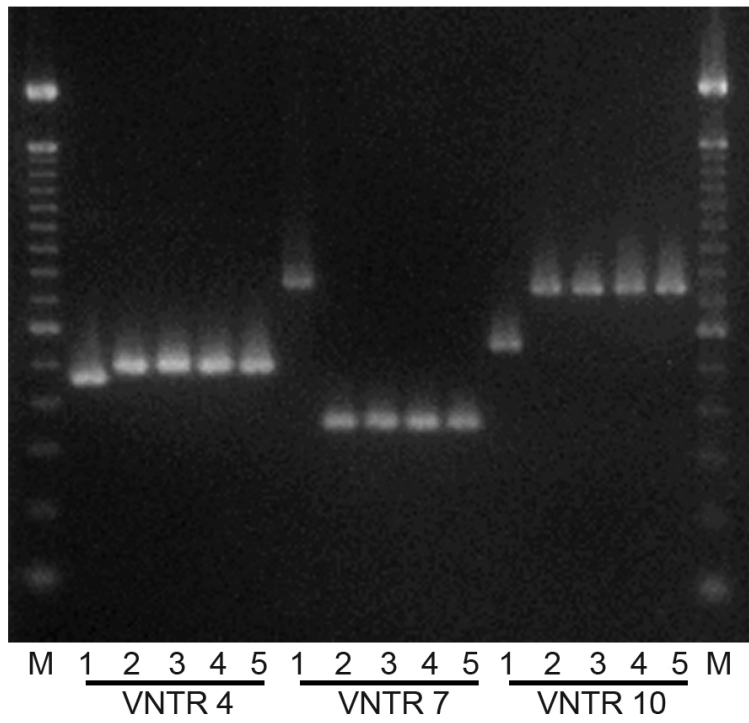
**Fig.2.** Distribution of reciprocal microagglutination (MAT) titers among dogs (N=97) in slum community at high risk for human leptospirosis in Salvador, Brazil according to presumptive infective serovar. Labels above the bars indicate the number of subjects (% of total), according to their highest reciprocal MAT titre. The open bar represents seronegative dogs. Dogs whose highest reciprocal titers were directed against serovar Copenhageni, multiple serovars, serovar Canicola and serovars other than Copenhageni are shown as black bars, grey bars, crosshatched bars and vertical-lined bars, respectively.

**Fig.3.** Gel electrophoresis patterns of PCR products obtained from amplification of VNTR 4, VNTR 7 and VNTR 10 loci from genomic DNA of *L. interrogans* serovar Canicola strain

Hond Utrecht (lane 1), two isolates obtained from dogs in the study area (lanes 2 and 3), *L. interrogans* serovar Copenhageni isolates, obtained from a rat (R1-60) and a patient during previous investigations in Salvador (Fiocruz L1-130) (lanes 4 and 5 respectively). Lane M is a 100 bp DNA ladder marker.









**Supplement table 1.** Risk of *Leptospira* infection among slum residents with dogs with and without serological evidence for prior *Leptospira* infection.\*

Criteria for seropositive subjects	Residents in household with:			OR (95% CI) 1 vs. 3	OR (95% CI) 2 vs. 3	
	Seropositive dog <sup>†</sup>	Seronegative dog (2)	No dog (3)			
MAT titer	N <sup>o</sup> of household subjects (%total)					
≥25	yes	23 (29)	05 (6)	51 (65)	1.70 (0.97-2.95)	0.29 (0.11-0.75)
	no	75 (17)	95 (21)	282 (62)		
≥50	yes	21 (33)	05 (8)	37 (59)	2.18 (1.21-3.94)	0.42 (0.16-1.10)
	no	77 (17)	95 (20)	296 (63)		
≥100	yes	19 (36)	05 (9)	29 (55)	2.52 (1.34-4.73)	0.55 (0.21-1.47)
	no	79 (17)	95 (20)	304 (64)		

\* MAT, microagglutination test; OR, odds ratio; CI, confidence interval.

<sup>†</sup> Definition criteria for seropositivity reaction was defined as MAT reciprocal titer  $\geq 1:100$

**Supplement table 2.** Risk factors for *Leptospira* antibodies among 550 inhabitants from a slum community in Salvador, Brazil.\*

Characteristics of Household of subjects	Seropositive <sup>†</sup> N=59	Seronegative N=491	OR (95% CI)
	No. (%) or mean (SD)		
Daily Per capita income (US\$) <sup>‡</sup>	1.02 (0.99)	1.87(1.75)	<0.01
Per capita income $\leq$ US\$1/day <sup>‡</sup>	37 (63)	173 (35)	3.09 (1.77-5.41)
Poverty Zone <sup>§</sup>			
1	31 (53)	125 (25)	5.66 (2.16-15.68)
2	22 (37)	229 (47)	1.45 (0.82-6.20)
3	6 (10)	137 (28)	1.0
Meters above lowest point in valley	13.81 (11.79)	20.51 (15.55)	<0.01
< 10 meters from			
an open sewer	35 (59)	208 (42)	1.98 (1.15-3.44)
an open refuse deposit	48 (81)	305 (62)	2.66 (1.35-5.25)
Puddle	38 (64)	219 (45)	2.25 (1.28-3.94)
Mud	46 (78)	258 (53)	3.20 (1.68-6.06)
Rat burrows	18 (31)	113 (23)	1.47 (0.81-2.66)
Vegetation	56 (95)	360 (73)	6.79 (2.09-22.08)
Banana trees	29 (49)	165 (34)	1.91 (1.11-3.29)
Street floods during rainy season	37 (63)	227 (46)	1.96 (1.12-3.41)
House floods during rainy season	16 (27)	80 (16)	1.91 (1.03-3.56)
Reservoirs present in household			
Chicken	17 (29)	61 (12)	2.85 (1.53-5.33)
Cat	24 (41)	104 (21)	2.55 (1.45-4.48)
Dog	24 (41)	174 (35)	1.25 (0.69-2.24)

Seropositive dog	19 (32)	79 (16)	2.18 (1.13-4.17)
------------------	---------	---------	------------------

---

\* CI, confidence interval; SD, standard deviation; MAT, microagglutination test; OR, odds ratio.

† Defined as having MAT reciprocal titer  $\geq 100$ .

‡ Values in dollars were calculated based on the current conversion rate of 1 dollar to 2.2 reais.

§ Defined using spatial mapping of poverty distribution in the urban areas of Bahia carried out by the State of Bahia.

## 5. Discussão

No presente estudo encontrou-se uma soroprevalência de 37% para leptospirose entre os cães avaliados com predomínio do sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* como provável sorovar infectante, resultado reforçado pelo isolamento de cepas deste mesmo sorogrupo na urina de dois cães avaliados. Estes dados evidenciam a ocorrência de circulação de leptospiros entre ratos e cães neste ambiente. Os isolados da urina dos cães quando comparados com cepas isoladas de um paciente de leptospirose grave e de um rato capturado em Salvador apresentaram o mesmo perfil genômico pela técnica de VNTR. Adicionalmente, observamos uma associação positiva entre a sorologia positiva dos cães e a evidência sorológica de exposição as leptospiros nos seus donos (OR= 2.18; 95% CI= 1.21 – 3.94).

Estes dados são similares aos descritos por outros pesquisadores que encontraram soroprevalência semelhante em animais errantes (Thiermann, 1980; Rivera Flores *et al.*, 1999; Rodriguez *et al.*, 2004; Jimenez-Coello *et al.*, 2008). Diferente de nosso estudo que foi realizado com cães domiciliados, mas que 58% destes poderiam ser considerados como semi-domiciliados, tendo acesso a rua, onde passam grande parte do dia. Comportamento que pode aumentar a exposição destes animais a ambientes potencialmente contaminados por leptospiros (OR = 2.20; 95% CI= 0.92-5.24).

Os dados do presente trabalho demonstraram uma grande circulação de leptospiros na população de cães em favelas urbanas. Similar aos descritos no estudo realizado em uma área

carente de Buenos Aires, com 57% dos cães soropositivos. Em ambos os estudos foi observada uma frequência muito pequena de sinais clínicos nos animais, indicando que a estimulação antigênica persistente pode levar a uma maior frequência de infecções assintomáticas (Rubel *et al.*, 1997).

O sorogrupo predominante nas reações de microaglutinação foi o Icterohaemorrhagiae, nos cães e também nas pessoas avaliadas, o mesmo encontrado em estudos de soroprevalência em pessoas de áreas de alto risco ou em pacientes com a forma grave de leptospirose em Salvador (Ko *et al.*, 1999; Reis *et al.*, 2008). Resultados que sugerem grande exposição a esse sorogrupo para as pessoas e cães em Pau da Lima.

Em relação aos fatores de risco para infecção por leptospira nos cães observamos que a idade e raça mestiça foram associados com maior presença de anticorpos contra leptospira, assim como observado por outros autores (Caldas *et al.*, 1977; Rubel *et al.*, 1997; Modolo *et al.*, 2000; Mascoll, 2002; Ward, 2002; Querino, 2003; Ward *et al.*, 2004; Meeyam *et al.*, 2006; Ghneim *et al.*, 2007). Ambos os fatores podem estar associados a uma maior exposição a leptospiros pois cães mais velhos e de raça mestiça tendem a permanecer mais nas ruas do que animais mais jovens e de raça pura (Ward, Guptill e Wu, 2004). Fatores de risco ambientais também foram identificados, mostrando que as áreas mais pobres, com deficiências como falta de saneamento básico e coleta de lixo irregular apresentaram um maior número de cães positivos. Observação também relatada com os casos de leptospirose humana em Salvador (Caldas *et al.*, 1977; Reis *et al.*, 2008).

Estudos prévios demonstraram que a posse de cães é um fator de risco para leptospirose (Douglin *et al.*, 1997; Jansen *et al.*, 2005), porém neste estudo não observamos maior soropositividade dentre os donos de cães em relação aos outros moradores da área do estudo, que não possuíam cão. Porém observamos um maior número de pessoas com evidência de infecção prévia por leptospira no grupo de donos de cães soropositivos. Dado que pode mostrar um maior risco para pessoas que convivem com cães, desde que estes apresentem evidência sorológica de infecção prévia para leptospirose, tendo em vista que somente cães que tenham se infectado previamente podem transmitir leptospira através de sua urina.

Porém, assim como em outros estudos de corte transversal, algumas limitações foram observadas como medidas de exposição qualitativas e baseadas em evidências históricas relatadas por seus donos. Assim como uma única medida sorológica não permite conclusões relacionadas ao tempo de infecção. Por outro lado, este estudo apresentou vantagens em relação a outros devido ao isolamento de leptospiros e sua caracterização molecular que permitiram a caracterização do cão como reservatório de leptospiros patogênicos, semelhantes a aquelas responsáveis pelas infecções de pessoas e ratos em Salvador. Porém devido à impossibilidade de identificar temporalidade entre a exposição e o desfecho não nos permite concluir seu papel como transmissor. Falha que não permite então uma melhor definição se o cão atua apenas como um marcador para infecções humanas ou se atua direta ou indiretamente na transmissão da leptospirose para as pessoas que compartilham com estes animais o mesmo ambiente.

Apesar disso, nossos achados podem contribuir para um melhor entendimento do papel do cão na leptospirose emergente nas comunidades carentes das grandes cidades. Reforçando a hipótese de que o cão pode transmitir direta ou indiretamente leptospirosas para as pessoas destes locais, dados que necessitam de mais pesquisas para serem confirmados.

A melhor definição da atuação dos cães no ambiente urbano é de grande importância atualmente, visto que anualmente vem sendo observados surtos de leptospirose nas grandes cidades principalmente nas favelas. Locais onde é observada uma grande concentração de cães, domiciliados ou errantes que poderiam se comprovado seu papel na transmissão, elevar muito o risco das pessoas residentes nestes locais de contrair leptospirose. Risco este que poderia ser reduzido com a introdução de intervenções de saúde pública urbana tais como vacinação e controle dos cães errantes.

## 6. Conclusões

Com base nas observações descritas neste trabalho, podemos concluir, portanto:

1. A soroprevalência para leptospirose em cães domiciliados em uma comunidade carente de Salvador foi de 37%.
2. A idade, a raça mestiça e a localização da casa de seu dono foram os principais fatores de risco para infecção por *Leptospira* nos cães avaliados.
3. As casas dos cães que apresentavam maior risco de infecção por leptospirosas se encontravam em maior número na zona mais pobre, demonstrando que o baixo nível sócio-econômico encontrado nestes locais pode estar associado.
4. Foram isoladas leptospirosas do sorovar Copenhageni, que apresentaram o mesmo perfil genético de isolados de rato capturado e de um caso de leptospirose grave também da cidade de Salvador, demonstrando a possibilidade de associação entre eles.
5. Foi observada associação entre a presença de cães com evidência de infecção prévia por leptospirosas e pessoas soropositivas na mesma casa. Assim como uma maior ocorrência de soroconversão nos indivíduos residentes em casas com cães soropositivos.



## 7. Referências Bibliográficas:

- Alves, C. J. A., J. S. L.; Vasconcellos, S. A. Et Al. Avaliação dos níveis de aglutininas anti-Leptospira em cães no município de Patos - PB, Brasil. Rev. Bras. Cienc. Vet., v.7, p.17-21. 2000.
- Amatoneto, V., C. Magaldi, *et al.* [Leptospirosis Canicola: Verification of an Outbreak Occurring in a Locality Very Close to S Ao Paulo (Capital)]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.10, Nov-Dec, p.265-70. 1963.
- Aslantas, O., V. Ozdemir, *et al.* Seroepidemiology of leptospirosis, toxoplasmosis, and leishmaniosis among dogs in Ankara, Turkey. Vet Parasitol, v.129, n.3-4, May 15, p.187-91. 2005.
- Barcellos, C. e P. Chagastelles Sabroza. Socio-environmental determinants of the leptospirosis outbreak of 1996 in western Rio de Janeiro: a geographical approach. Int J Environ Health Res, v.10, n.4, p.301-13. 2000.
- Barcellos, C. e P. C. Sabroza. The place behind the case: leptospirosis risks and associated environmental conditions in a flood-related outbreak in Rio de Janeiro. Cad Saude Publica, v.17, n.Suppl, p.59-67. 2001.
- Barkin, R. M. e J. W. Glosser. Leptospirosis--an epidemic in children. Am J Epidemiol, v.98, n.3, p.184-91. 1973.
- Barocchi, M. A., A. I. Ko, *et al.* Identification of new repetitive element in *Leptospira interrogans* serovar copenhageni and its application to PCR-based differentiation of *Leptospira* serogroups. J Clin Microbiol, v.39, n.1, January, p.191-195. 2001.
- Bharti, A. R., J. E. Nally, *et al.* Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. Lancet Infect Dis, v.3, n.12, Dec, p.757-71. 2003.
- Boland, M., G. Sayers, *et al.* A cluster of leptospirosis cases in canoeists following a competition on the River Liffey. Epidemiol Infect, v.132, n.2, Apr, p.195-200. 2004.
- Brod, C. S., J. A. Aleixo, *et al.* [Evidence of dog as a reservoir for human leptospirosis: a serovar isolation, molecular characterization and its use in a serological survey]. Rev Soc Bras Med Trop, v.38, n.4, Jul-Aug, p.294-300. 2005.
- Burriel, A. R., C. Dalley, *et al.* Prevalence of leptospira species among farmed and domestic animals in Greece. Vet Rec, v.153, n.5, Aug 2, p.146-8. 2003.
- Caldas, E. M., J. D. Doria, *et al.* Immunological inquiry for the epidemiology of leptospirosis in *Canis familiaris* in Salvador, Bahia, Brazil. Int J Zoonoses, v.4, n.2, p.103-10. 1977.

- Caldas, E. M. e M. B. Sampaio. Leptospirosis in the city of Salvador, Bahia, Brazil: a case-control seroepidemiologic study. Int J Zoonoses, v.6, n.2, p.85-96. 1979.
- Collares-Pereira, M., M. L. Mathias, *et al.* Rodents and *Leptospira* transmission risk in Terceira island (Azores). Eur J Epidemiol, v.16, n.12, p.1151-7. 2000.
- Cumberland, P., C. O. Everard, *et al.* Assessment of the efficacy of an IgM-ELISA and microscopic agglutination test (MAT) in the diagnosis of acute leptospirosis. Am J Trop Med Hyg, v.61, n.5, p.731-734. 1999.
- Davis, M. A., J. F. Evermann, *et al.* Serological Survey for Antibodies to *Leptospira* in Dogs and Raccoons in Washington State. Zoonoses Public Health, Jul 3. 2008.
- De Figueiredo, C. M., A. C. Mourao, *et al.* [Human leptospirosis in Belo Horizonte City, Minas Gerais, Brazil: a geographic approach]. Rev Soc Bras Med Trop, v.34, n.4, Jul-Aug, p.331-8. 2001.
- De Lima, S. C., E. E. Sakata, *et al.* [Outbreak of human leptospirosis by recreational activity in the municipality of Sao Jose dos Campos, Sao Paulo. Seroepidemiological study]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.32, n.6, p.474-9. 1990.
- Dickeson, D. e D. N. Love. A serological survey of dogs, cats and horses in south-eastern Australia for leptospiral antibodies. Australian Veterinary Journal, v.70, n.10, p.389-390. 1993.
- Douglin, C. P., C. Jordan, *et al.* Risk factors for severe leptospirosis in the parish of St. Andrew, Barbados [letter]. Emerg Infect Dis, v.3, n.1, p.78-80. 1997.
- Faine, S. B., B. Adler, *et al.* Leptospira and leptospirosis. Melbourne, Australia: MediSci. 1999
- Faria, M. T., M. S. Calderwood, *et al.* Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. Acta Trop, Jul 31. 2008.
- Feigin, R. D., L. A. Lobes, Jr., *et al.* Human leptospirosis from immunized dogs. Ann Intern Med, v.79, n.6, p.777-85. 1973.
- Fraser, D. W., J. W. Glosser, *et al.* Leptospirosis caused by serotype Fort-Bragg. A suburban outbreak. Ann Intern Med, v.79, n.6, p.786-9. 1973.
- Ganoza, C. A., M. A. Matthias, *et al.* Determining Risk for Severe Leptospirosis by Molecular Analysis of Environmental Surface Waters for Pathogenic *Leptospira*. PLoS Med, v.3, n.8, Aug 22, p. 1329-1340. 2006.

Geisen, V., C. Stengel, *et al.* Canine leptospirosis infections - clinical signs and outcome with different suspected *Leptospira* serogroups (42 cases). J Small Anim Pract, v.48, n.6, Jun, p.324-8. 2007.

Ghneim, G. S., J. H. Viers, *et al.* Use of a case-control study and geographic information systems to determine environmental and demographic risk factors for canine leptospirosis. Vet Res, v.38, n.1, Jan-Feb, p.37-50. 2007.

Goldstein, R. E., R. C. Lin, *et al.* Influence of infecting serogroup on clinical features of leptospirosis in dogs. J Vet Intern Med, v.20, n.3, May-Jun, p.489-94. 2006.

Gouveia, E. L., J. Metcalfe, *et al.* Leptospirosis-associated Severe Pulmonary Hemorrhagic Syndrome, Salvador, Brazil. Emerg Infect Dis, v.14, n.3, Mar, p.505-508. 2008.

Harkin, K. R., Y. M. Roshto, *et al.* Comparison of polymerase chain reaction assay, bacteriologic culture, and serologic testing in assessment of prevalence of urinary shedding of leptospires in dogs. J Am Vet Med Assoc, v.222, n.9, May 1, p.1230-3. 2003.

Health Surveillance Secretary, B. M. O. H. Leptospirosis case confirmation records, Brazil. 2008.

Jansen, A., I. Schoneberg, *et al.* Leptospirosis in Germany, 1962-2003. Emerg Infect Dis, v.11, n.7, Jul, p.1048-54. 2005.

Jimenez-Coello, M., I. Vado-Solis, *et al.* Serological survey of canine leptospirosis in the tropics of Yucatan Mexico using two different tests. Acta Trop, Jan 5, n.106 (1), p. 22-26. 2008.

Jones, C. J., K. R. Sulzer, *et al.* Bim, a new serovar of *Leptospira interrogans* isolated from a dog in Barbados. J Clin Microbiol, v.19, n.6, p.946. 1984.

Ko, A. I., M. Galvao Reis, *et al.* Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. Lancet, v.354, n.9181, p.820-5. 1999.

Kupek, E., M. C. De Sousa Santos Favarsani, *et al.* The relationship between rainfall and human leptospirosis in Florianopolis, Brazil, 1991-1996. Braz J Infect Dis, v.4, n.3, p.131-4. 2000.

Langston, C. E. e K. J. Heuter. Leptospirosis. A re-emerging zoonotic disease. Vet Clin North Am Small Anim Pract, v.33, n.4, Jul, p.791-807. 2003.

Langton Sd, C. D., Meyer An. . The occurrence of commensal rodents in dwellings as revealed by the 1996 English House Condition Survey. J App Ecol, v.38, p.699-709. 2001.

Larocque, R. C., R. F. Breiman, *et al.* Leptospirosis during dengue outbreak, Bangladesh. Emerg Infect Dis, v.11, n.5, May, p.766-9. 2005.

Leal-Castellanos, C. B., R. Garcia-Suarez, *et al.* Risk factors and the prevalence of leptospirosis infection in a rural community of Chiapas, Mexico. Epidemiol Infect, v.131, n.3, Dec, p.1149-56. 2003.

Levett, P. N. Leptospirosis. Clin Microbiol Rev, v.14, n.2, Apr, p.296-326. 2001.

Maciel, E. A., A. L. De Carvalho, *et al.* Household transmission of leptospira infection in urban slum communities. PLoS Negl Trop Dis, v.2, n.1, p.e154. 2008.

Majed, Z., E. Bellenger, *et al.* Identification of variable-number tandem-repeat loci in *Leptospira interrogans sensu stricto*. J Clin Microbiol, v.43, n.2, Feb, p.539-45. 2005.

Mascoll, R. P., S. R.; Vasconcellos, S. A.; Ferreira, F.; Morais, Z. M.; Pinto, C. O.; Sucupira, M. C. A.; Dias, R. A.; Miraglia, F.; Cortez, A.; Silveira Da Costa, S.; Tabata, R.; Marcondes, A. G. . Inquérito sorológico para leptospirose em cães do município de Santana de Parnaíba, São Paulo, utilizando a campanha de vacinação anti-rábica do ano de 1999. Arq Inst Biol, v.69, n.2, abr/jun, p.25-32. 2002.

Matthias, M. A. e P. N. Levett. Leptospiral carriage by mice and mongooses on the island of Barbados. West Indian Med J, v.51, n.1, Mar, p.10-3. 2002.

Mcbride, A. J., D. A. Athanazio, *et al.* Leptospirosis. Curr Opin Infect Dis, v.18, n.5, Oct, p.376-86. 2005.

Meeyam, T., P. Tablerk, *et al.* Seroprevalence and risk factors associated with leptospirosis in dogs. Southeast Asian J Trop Med Public Health, v.37, n.1, Jan, p.148-53. 2006.

Merien, F. e P. Perolat. Public health importance of human leptospirosis in the South Pacific: a five-year study in New Caledonia. Am J Trop Med Hyg, v.55, n.2, p.174-8. 1996.

Miller, R. I., S. P. Ross, *et al.* Clinical and epidemiological features of canine leptospirosis in North Queensland. Aust Vet J, v.85, n.1-2, Jan-Feb, p.13-9. 2007.

Modolo, J. R., D. A. Berto, *et al.* Seroprevalence of leptospira interrogans serovar djasiman in quarantined pigs. Indian Veterinary Journal, v.77, n.2, p.155-156. 2000.

Morgan, J., S. L. Bornstein, *et al.* Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998. Clinical Infectious Diseases, v.34, n.12, 15 June, p.1593-1599. 2002.

Pereira, M. M. e J. Andrade. Epidemiological aspects of leptospirosis in a slum area in the city of Rio de Janeiro, Brazil. Search for leptospires and specific antibodies in rodents. Trans R Soc Trop Med Hyg, v.82, n.5, p.768-70. 1988.

\_\_\_\_\_. Human leptospirosis in a slum area in the city of Rio de Janeiro, Brazil--a serological and epidemiological study. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.85, n.1, p.47-52. 1990.

- Pestana De Castro, A. F. S. R., C. A.; Troise, C.; Caldas, A. D. Leptospirose Canina em São Paulo: Inquérito Sorológico e Isolamento da *L. icterohaemorrhagiae*. Arquivos do Instituto Biológico, v.29, p.199-205. 1962.
- Prescott, J. Canine leptospirosis in Canada: a veterinarian's perspective. Cmaj, v.178, n.4, Feb 12, p.397-8. 2008.
- Querino, A. M. V. D., A. C. B.; Oliveira, R. C.; Silva, F. G., Muller, E. E.; Freire, R. L.; Freitas, J. C. . Fatores de risco associados à leptospirose em cães do município de Londrina-PR. . Semina: Ciências Agrárias, v.24, n.1, p.27-34. 2003.
- Reis, R. B., G. S. Ribeiro, *et al.* Impact of environment and social gradient on leptospira infection in urban slums. PLoS Negl Trop Dis, v.2, n.4, p.e228. 2008.
- Riley, L. W., A. I. Ko, *et al.* Slum health: diseases of neglected populations. BMC Int. Health Hum. Rights, v.7, p.2. 2007.
- Rivera Flores, A., M. De Los Angeles Roa Riol, *et al.* Leptospirosis seroprevalence in stray dogs from northern Mexico City. Veterinaria - Mexico, v.30, n.1, p.105-108. 1999.
- Rodriguez, A. L., B. E. Ferro, *et al.* [Exposure to *Leptospira* in stray dogs in the city of Cali]. Biomedica, v.24, n.3, Sep, p.291-5. 2004.
- Romero, E. C., C. C. Bernardo, *et al.* Human leptospirosis: a twenty-nine-year serological study in Sao Paulo, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.45, n.5, Sep-Oct, p.245-8. 2003.
- Rossetti, C. A., M. Liem, *et al.* Buenos Aires, a new *Leptospira* serovar of serogroup Djasiman, isolated from an aborted dog fetus in Argentina. Vet Microbiol, v.107, n.3-4, May 20, p.241-8. 2005.
- Rubel, D., A. Seijo, *et al.* [*Leptospira interrogans* in a canine population of Greater Buenos Aires: variables associated with seropositivity]. Rev Panam Salud Publica, v.2, n.2, p.102-5. 1997.
- Sakata, E. E., P. H. Yasuda, *et al.* [The serovars of *Leptospira interrogans* isolated from cases of human leptospirosis in Sao Paulo, Brazil]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.34, n.3, p.217-21. 1992.
- Sarkar, U., S. F. Nascimento, *et al.* Population-based case-control investigation of risk factors for leptospirosis during an urban epidemic. Am J Trop Med Hyg, v.66, n.5, May, p.605-10. 2002.
- Saúde, S. M.-S. D. V. E. S.-M. D. Casos confirmados no Brasil , 1997-2006. 2008.
- Scanziani, E., S. Calcaterra, *et al.* Serological findings in case of acute leptospirosis in the dog. Journal of Small Animal Practice, v.35, n.5, p.257-260. 1994.

Schmidt, D. R., R. E. Winn, *et al.* Leptospirosis. Epidemiological features of a sporadic case. Arch Intern Med, v.149, n.8, p.1878-80. 1989.

Secomp, S. D. C. A. P. E. A. D. S.-. Mapeamento da pobreza em áreas urbanas do estado da Bahia. . Salvador 2005.

Sunbul, M., S. Esen, *et al.* Rattus norvegicus acting as reservoir of leptospira interrogans in the Middle Black Sea region of Turkey, as evidenced by PCR and presence of serum antibodies to Leptospira strain. Scand J Infect Dis, v.33, n.12, p.896-8. 2001.

Tassinari Wde, S., C. Pellegrini Dda, *et al.* [Spatial distribution of leptospirosis in the city of Rio de Janeiro, Brazil, 1996-1999]. Cad Saude Publica, v.20, n.6, Nov-Dec, p.1721-9. 2004.

Tassinari, W. S., D. C. Pellegrini, *et al.* Detection and modelling of case clusters for urban leptospirosis. Trop Med Int Health, Feb 27. 2008.

Thiermann, A. B. Incidence of leptospirosis in the detroit rat population. Am J Trop Med Hyg, v.26, n.5 Pt 1, p.970-4. 1977.

\_\_\_\_\_. Canine leptospirosis in Detroit. Am J Vet Res, v.41, n.10, p.1659-61. 1980.

Trejevo, R. T., J. G. Rigau-Perez, *et al.* Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua, 1995. Journal of Infectious Diseases, v.178, n.5, p.1457-1463. 1998.

Viegas, A. R. A., E. M. Caldas, *et al.* Aglutininas anti-leptospira em hemossoro de animais domésticos de diferentes espécies, no Estado da Bahia, 1997/1999. Rev. Bras. Saúde Prod. An., v.1, n.1, p.1-6. 2001.

Viegas, S. A. R. D. A. T., C. H. T.; Oliveira, E. M. De D.; Dias, A. R.; Mendonça, F. F.; Santos, M. De F. P. Investigação sorológica para leptospirose em cães errantes na cidade de Salvador - Bahia. Rev. Bras. Saúde Prod. An., v.2, n.1, p.21 - 30. 2001.

Vinetz, J. M., G. E. Glass, *et al.* Sporadic urban leptospirosis. Ann Intern Med, v.125, n.10, p.794-8. 1996.

Ward, M. P. Seasonality of canine leptospirosis in the United States and Canada and its association with rainfall. Prev Vet Med, v.56, n.3, Dec 30, p.203-13. 2002.

Ward, M. P., L. T. Glickman, *et al.* Prevalence of and risk factors for leptospirosis among dogs in the United States and Canada: 677 Cases (1970-1998). Journal of the American Veterinary Medical Association, v.220, n.1, p.53-58. 2002.

Ward, M. P., L. F. Guptill, *et al.* Serovar-specific prevalence and risk factors for leptospirosis among dogs: 90 cases (1997-2002). J Am Vet Med Assoc, v.224, n.12, Jun 15, p.1958-63. 2004.

\_\_\_\_\_. Evaluation of environmental risk factors for leptospirosis in dogs: 36 cases (1997-2002). J Am Vet Med Assoc, v.225, n.1, Jul 1, p.72-7. 2004.

Weekes, C. C., C. O. Everard, *et al.* Seroepidemiology of canine leptospirosis on the island of Barbados. Vet Microbiol, v.57, n.2-3, p.215-22. 1997.

Weekes, C. C., C. O. R. Everard, *et al.* Seroepidemiology of canine leptospirosis on the island of Barbados. Veterinary Microbiology, v.57, n.2-3, p.215-222. 1997.

Yasuda, P. H., C. A. Santa Rosa, *et al.* The isolation of leptospire from stray dogs in the city of Sao Paulo, Brazil. Int J Zoonoses, v.7, n.2, p.131-4. 1980.

\_\_\_\_\_. [Seasonal variation in the prevalence of leptospirosis in stray dogs in Sao Paulo, Brazil]. Rev Saude Publica, v.14, n.4, Dec, p.589-96. 1980.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)



[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)