

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ

MANUELLA OLIVEIRA LAVINSKY

**SOROPREVALÊNCIA, FATORES DE RISCO E DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DE
ANTICORPOS ANTI-*Leptospira* spp. EM CÃES DO MUNICÍPIO DE ILHÉUS,
BAHIA, BRASIL**

**ILHÉUS – BAHIA
2009**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

MANUELLA OLIVEIRA LAVINSKY

**SOROPREVALÊNCIA, FATORES DE RISCO E DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DE
ANTICORPOS ANTI-*Leptospira* spp. EM CÃES DO MUNICÍPIO DE ILHÉUS,
BAHIA, BRASIL**

Dissertação apresentada, para obtenção do título
de Mestre em Ciência Animal, à Universidade
Estadual de Santa Cruz

Área de concentração: Ciência Animal

Orientador: Profa. Dra. Roueda Abou Said

**ILHÉUS-BAHIA
2009**

MANUELLA OLIVEIRA LAVINSKY

**SOROPREVALÊNCIA, FATORES DE RISCO E DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DE
ANTICORPOS ANTI-*Leptospira* spp. EM CÃES DO MUNICÍPIO DE ILHÉUS,
BAHIA, BRASIL**

Ilhéus – BA, 29/09/2009

Roueda Abou Said – Profa. Dra.
UESC/DCAA
(Orientador)

Hélio Langoni – Prof. PhD
UNESP

Roberta Costa Dias – Profa. Dra.
UESC/DCAA

Gil Marcelo Reuss Strenzel – Prof. Dr.
UESC/DCAA

A solução é voltar ao marco zero.

Desaprender para aprender.

Deletar para escrever em cima.

*Houve um tempo em que eu pensava que, para isso, seria preciso nascer de novo,
mas hoje sei que dá pra renascer várias vezes nesta mesma vida.*

Basta desaprender o receio de mudar.

(Martha Medeiros)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado forças para finalizar este trabalho e por estar sempre presente para que eu pudesse superar os obstáculos encontrados nesta minha caminhada.

Aos meus pais, Cezar e Rita. Foram vocês que com grandes dificuldades deram as maiores jóias que uma filha pode receber: a vida, o amor e a educação. Pelo apoio e estímulo na busca pelos meus sonhos. A minha irmã Alyne pela amizade, companhia e ajuda durante os relatórios da bolsa FAPESB.

Ao meu amado Junior Novaes pelo incentivo, amor, carinho, amizade, compreensão e pelas horas em que estive ao meu lado para me ajudar em tudo aquilo em que eu pudesse vir a precisar.

A minha orientadora Roueda, que acreditou e confiou em mim na realização desse projeto. Por ser mais que orientadora, mas também uma grande amiga: agradeço pela atenção, disposição e por todas as horas dedicadas a me ajudar. Gostaria de agradecer também pela oportunidade de participar nas pesquisas ligadas a oncologia, o que aprimorou meu conhecimento profissional e pessoal. Eu não sei que seria de mim sem uma orientadora tão dedicada e inteligente como você.

Ao professor e coordenador do mestrado George Albuquerque. Pela oportunidade de fazer o mestrado e pelos ensinamentos fundamentais adquiridos na disciplina testes parasitológicos.

Ao professor e ex-orientador Alexandre Dias Munhoz por ter dado boas referências minhas para minha orientadora e por isso ela ter me aceitado como orientada. Gostaria de agradecer também pelos conhecimentos transmitidos durante e após a disciplina de hematologia veterinária que são essenciais na minha formação pessoal e profissional. Obrigada também por facilitar o processamento do material do meu projeto no Laboratório de análises clínicas, pelas solicitações de veículo e pelos ensinamentos no cálculo de amostragem no Epiinfo. Obrigada também pelo carinho e amizade sempre quando o procuro.

Ao professor Sérgio Oliveira pelos ensinamentos na disciplina do mestrado Estatística Aplicada a Experimentação Animal e também no auxílio das análises dos resultados do meu projeto. Pela amizade e carinho ao me receber em sua casa para tirar as dúvidas e emprestar livros valiosíssimos na minha aprendizagem.

Ao prof. Gil Strenzel, pela ajuda mesmo quando estava de férias, pela confecção e lay-out dos mapas do projeto e na análise dos dados. Sem ele, a introdução de SIG não seria possível. Obrigada pelos conhecimentos de SIG fornecidos, pela paciência e também pela amizade.

Ao prof Hélio Langoni (UNESP- Botucatu) e equipe, em especial a residente Rozeani Olimpio, pela colaboração e processamento das amostras.

A professora Fabiana Lessa pelos ensinamentos na disciplina do mestrado Diagnóstico Post-Mortem que serão muito úteis em provas didáticas em concursos.

Ao estudante do mestrado de SAT/UESC, Cezinha, na formatação dos mapas e legendas. Obrigada também pela disposição e paciência.

Aos estudantes de veterinária e amigos Nancy, Lorena, Raquel, Danielle, Lívia, Maíra, Lucyanne, Ivan, Aline, Laís, Jéssica, Tiago. Sem a ajuda essencial deles, eu não teria conseguido coletar o sangue dos cães tão rapidamente. Alguns até filaram aula para isso. Sem eles, as coletas não teriam a menor graça.

Aos funcionários Givaldo e Joíra na ajuda nas coletas e na eterna amizade.

Aos funcionários da cozinha Lita, D. Antônia e Tina pelos chás ou soro caseiro e pelas conversas.

Aos motoristas da UESC, em especial Renato e Franco pelo apoio e compreensão durante as coletas sanguíneas de cães.

Aos colegas de mestrado e também amigos, em especial Alice, Aracele, Adriana, Patrícia, Luciana pela cumplicidade que fizeram com que convivêssemos em harmonia nestes dois anos.

A minha grande amiga Elza pela amizade e pelos ensinamentos em hematologia, no uso do programa epiinfo e na ajuda em minhas coletas iniciais.

À FAPESB pela concessão da bolsa de estudo e financiamento do projeto.

Muito obrigada!!!!

SOROPREVALÊNCIA, FATORES DE RISCO E DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DE ANTICORPOS ANTI-*Leptospira* spp. EM CÃES DO MUNICÍPIO DE ILHÉUS, BAHIA, BRASIL

RESUMO

A leptospirose é uma zoonose emergente amplamente distribuída no mundo, causada por diferentes sorovares da bactéria *Leptospira* e que acomete o homem e os animais domésticos e silvestres, assumindo considerável importância em termos de saúde pública e problemas econômicos. Em algumas regiões, é considerada uma doença ocupacional ou recreacional, mas sua principal incidência é observada em países em desenvolvimento de clima tropical devido às precárias condições de saneamento básico. Para a compreensão dos aspectos epidemiológicos relacionados à doença, o reconhecimento dos sorovares é de fundamental importância, uma vez que existe relação entre sorovares e espécies de hospedeiro acometidas. A infecção no homem ocorre por transmissão direta ou indireta de ambientes contaminados ou pela urina de animais infectados. Dentre eles, os roedores e os cães são os mais implicados nesta transmissão por estarem mais próximos do homem. Para o diagnóstico de leptospirose, a prova de soroaglutinação microscópica é considerada a mais recomendada pela Organização Mundial de Saúde, e possivelmente o conhecimento dos sorovares e sorogrupos em determinada população, podendo apontar prováveis reservatórios para a doença. Com o avanço dos recursos computacionais e a adoção das técnicas de geoprocessamento, os estudos da relação entre o espaço e o processo saúde-doença assumiram considerável relevância na tomada de decisão em saúde pública. Sabe-se que Saúde Pública e ambiente são fortemente influenciadas pelas formas de ocupação do espaço e suas relações podem ser evidenciadas pela análise de características epidemiológicas das áreas próximas às fontes de contaminação e pela identificação de fatores ambientais adversos em locais onde há concentração de agravos à saúde. Certamente, o desafio atual para a epidemiologia é desenvolver trabalhos centrados na perspectiva da valorização do espaço, explorando as potencialidades de métodos inovadores do ponto de vista das intervenções em saúde pública.

Palavras-chave: epidemiologia, zoonoses, veterinária.

SEROPREVALENCE, RISK FACTORS AND SPATIAL DISTRIBUTION OF ANTIBODY ANTI-*Leptospira* spp. IN DOGS ON THE CITY OF ILHÉUS, BAHIA, BRAZIL

Leptospirosis is an emerging zoonosis widely distributed in the world caused by different serovars of *Leptospira* bacteria, affecting humans and domestic and wild animals, taking on considerable importance in terms of public health and economic problems. In some regions, is considered an occupational disease or recreational, but its main effect is observed in developing countries with tropical climates due to poor sanitation conditions. To understand the epidemiology of the disease, the recognition of serovars is of fundamental importance, since there is a relationship between serovars and host species affected. Infection in humans occurs by direct or indirect transfer of contaminated environments or in the urine of infected animals. Among them, rodents and dogs are more involved in transmission because they are closer to man. For the diagnosis of leptospirosis, microscopic agglutination test is considered the most recommended by World Health Organization, and possibly the knowledge of the serovars and serogroups in a given population, and may point likely reservoirs for the disease. With the advancement of computing resources and the adoption of geospatial technologies, studies of the relationship between space and the health-disease assumed considerable importance in decision-making in public health. It is known that public health and the environment are strongly influenced by the occupation of space and its relations can be evidenced by the analysis of epidemiological characteristics of areas near the sources of contamination and the identification of adverse environmental factors in places where there are more injuries to the health. Indeed, the current challenge for epidemiology is to develop studies focused on the prospect for recovery of space, exploring the potential of innovative methods in terms of public health interventions.

Keywords: epidemiology, zoonosis, veterinary

SUMÁRIO

		Pag.
Resumo.....		vi
Abstract.....		vii
Lista de figuras.....		viii
Lista de tabelas.....		ix
1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	3
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22
3	SOROPREVALÊNCIA, FATORES DE RISCO E DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DE ANTICORPOS ANTI-<i>Leptospira</i> spp. EM CÃES DO MUNICÍPIO DE ILHÉUS, BAHIA, BRASIL.....	30
	Resumo.....	31
	Abstract.....	33
	INTRODUÇÃO.....	33
	MATERIAL E MÉTODOS.....	37
	RESULTADOS.....	42
	DISCUSSÕES.....	44
	CONCLUSÕES.....	49
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
4	SORO-EPIDEMIOLOGIA DA <i>Leptospira</i> spp. EM CÃES DO MUNICÍPIO DE ILHÉUS, BA , BRASIL: SOROVARES, IMPLICAÇÕES PARA VACINAÇÃO E SAÚDE PÚBLICA.....	68
	Resumo.....	69
	Abstract.....	70

	INTRODUÇÃO.....	71
	MATERIAL E MÉTODOS.....	73
	RESULTADOS.....	76
	DISCUSSÕES.....	77
	CONCLUSÕES.....	82
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
	ANEXO 1.....	92
	ANEXO 2.....	

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é a zoonose emergente mais disseminada no mundo, causada por diferentes sorovares da bactéria *Leptospira* spp. (WHO, 2003; McBRIDE et al., 2005; ADLER; MOCTEZUMA, 2009). Acomete o homem e os animais domésticos e silvestres, assumindo considerável importância em termos de saúde pública e problemas econômicos (BARCELLOS et al., 2003).

Nos últimos anos, foram registrados surtos de leptospirose humana em diversos países como Peru (RUSSEL et al., 2003; CÉSPEDES et al., 2004), Japão (NARITA et al., 2005), Colômbia (GÓNGORA et al., 2008) e Índia (VIJAYACHARI et al., 2008). No Brasil, surtos da doença ocorreram em bairros com baixa infra-estrutura sanitária (REIS et al., 2008; MACIEL et al., 2008) ou em condições ambientais associadas à estação chuvosa (BARCELLOS; SABROZA, 2000; BARCELLOS et al., 2003; TASSINARI et al., 2008).

Segundo dados do Ministério da Saúde, entre os anos de 1997 e 2008, foram confirmados no Brasil, 39.677 casos de leptospirose em humanos, com índices de letalidade variando de 8,5% a 12,7%. Nesse mesmo período, a região Nordeste registrou 7.738 dos casos, o que correspondeu a 19,5% dos casos que ocorreram no país. Dentre os estados do nordeste, a Bahia foi segundo maior em número de casos registrados, principalmente entre os meses de março a julho (BRASIL, 2009).

A leptospirose pode ocorrer enquanto uma doença ocupacional, acometendo produtores rurais, pescadores, limpadores de fossa, entre outros, que estão expostos aos ambientes contaminados pela urina dos animais infectados (RUSSEL et al, 2003; GÓNGORA et al., 2008). Pode ainda afetar a população urbana, sobretudo em países em desenvolvimento de clima tropical, pelas deficientes condições de saneamento básico (BROD et al., 2005; FARIA et al., 2008). Também pode ocorrer como uma doença recreacional, acometendo indivíduos que praticam atividades de esporte e lazer, em

ambientes aquáticos contaminados pela bactéria (NARITA et al, 2005; WATSON et al., 2007)

O avançar desordenado da urbanização sobre o ambiente natural teve como conseqüências desequilíbrios ecológicos e problemas de infra-estrutura que facilitaram a disseminação da leptospirose para o meio urbano. Além disto, as relações estabelecidas entre o homem e os demais hospedeiros da leptospirose são responsáveis por perpetuar o ciclo epidemiológico da doença, uma vez que diferentes espécies animais são hospedeiros de sorovares distintos de *Leptospira* spp. (ADLER; MOCTEZUMA, 2009).

Nesta revisão de literatura, serão abordados os principais aspectos relacionados à doença, com ênfase nas questões epidemiológicas, incluindo a utilização de sistemas de informação geográfica como ferramenta de análise da associação entre saúde/doença e o espaço.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Taxonomia e classificação

O agente etiológico da leptospirose, pertence à ordem *Spirochaetales*, família *Leptospiraceae*, gênero *Leptospira*. Sua classificação pode basear-se em dois critérios, segundo determinantes antigênicos ou critérios genéticos (QUINN et al., 2005).

A classificação antigênica ou fenotípica foi estabelecida primeiramente e divide o gênero *Leptospira* em duas espécies, *L. interrogans*, contendo as cepas patogênicas, e a *L. biflexa*, com cepas saprófitas, isoladas do meio ambiente. Esta classificação estabelece como base taxonômica os sorovares, que por sua vez são definidos pela presença de antígenos de superfície específicos. Segundo esta classificação mais de 250 sorovares foi reconhecida, e aqueles que apresentam similaridade antigênica foram agrupados em 24 sorogrupos, conforme descrito na tabela 1 (LEVETT, 2001; VIJAYACHARI et al. 2008). Embora os sorogrupos não possuam valor taxonômico, seu conhecimento é relevante para o monitoramento de estudos epidemiológicos e para a compreensão dos eventos relacionados à doença (GREENE et al., 2006).

A partir de 1989, com o advento das técnicas de biologia molecular, surgiu a classificação baseada em critérios genéticos, sendo que as espécies de *Leptospira* passaram a ser denominadas de genomoespécies. Segundo esta nova classificação, uma genomoespécie pode conter cepas patogênicas e saprófitas. Nesse contexto, foram reconhecidas 14 genomoespécies como *L. interrogans*, *L. biflexa*, *Leptospira borgpetersenii*, *Leptospira santarosai*, *Leptospira inadai*, *Leptospira noguchii*, *Leptospira weilii*, *Leptospira kirshneri*, *Leptospira meyeri*, *Leptospira wolbachii*, e as geno-espécies 1, 3, 4 e 5 de *Leptospira*, ainda sem denominação (Tabela 2) (LEVETT, 2001).

Tabela 1 – Sorogrupos e principais sorovares de *L. interrogans* sensu lato, classificados segundo critérios sorológicos.

SOROGRUPO	SOROVAR
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Lai, Zimbabwe
Hebdomadis	Hebdomadis, Jules, Kremastos
Autumnalis	Autumnalis, Forttbragg, Bim, Weerasinghe
Pyrogenes	Pyrogenes
Bataviae	Bataviae
Grippothyphosa	Grippothyphosa, Canalzonae, Ratnapura
Canicola	Canicola
Australis	Australis, Bratislava, Iora
Pomona	Pomona
Javanica	Javanica
Sejroe	Sejroe, Saxkoebing, Hardjo
Panamá	Panamá, Mangus
Cynopteri	Cynopteri
Djasiman	Djasiman
Sarmin	Sarmin
Mini	Mini, Geórgia
Tarassovi	Tarassovi
Ballum	Ballum, Aroborea
Celledoni	Celledoni
Louisiana	Louisiana, Lanka
Ranarum	Ranarum
Manhao	Manhao
Shermani	Shermani
Hurstbridge	Hurstbridge

Fonte: LEVETT (2001)

Tabela 2. Genomoespécies e sorogrupos de *Leptospira* sp., classificadas segundo critérios moleculares.

Sorogrupo	Genomoespécies
Andamana	<i>L. biflexa</i>
Australis	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L.kirschneri</i>
Autumnalis	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L.kirschneri</i>
Ballum	<i>L. borgpetersenii</i>
Bataviae	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. kirschneri</i>
Canicola	<i>L. interrogans</i> , <i>L. inadai</i> , <i>L.kirschneri</i>
Celledoni	<i>L. weilii</i> , <i>L. borgpetersenii</i>
Codíce	<i>L. wolbachii</i>
Cynopteri	<i>L.santarosai</i> , <i>L. kirschneri</i>
Djasiman	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. kirschneri</i>
Grippotyphosa	<i>L. interrogans</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L.kirschneri</i>
Hebdomadis	<i>L. interrogans</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L.kirschneri</i> , <i>L. alexanderi</i>
Hurstbridge	<i>L. fainei</i>
Icterohaemorrhagiae	<i>L. interrogans</i> , <i>L. inadai</i> , <i>L.kirschneri</i> , <i>L. weilii</i>
Javanica	<i>L. weilii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. meyeri</i> , <i>L. inadai</i> , <i>L. alexanderi</i>
Louisiana	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i>
Lyme	<i>L. inadai</i>
Manbao	<i>L. weilii</i> , <i>L. inadai</i> , <i>L. alexanderi</i>
Mini	<i>L. interrogans</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L.meyeri</i> , <i>L. alexanderi</i>
Panama	<i>L. noguchii</i> , <i>L. inadai</i>
Pomona	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L.kirschneri</i>
Pyrogenes	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L.kirschneri</i>
Ranarum	<i>L. interrogans</i> , <i>L. meyeri</i>
Sarmin	<i>L. interrogans</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. santarosai</i>
Sejroe	<i>L. interrogans</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L.meyeri</i>
Semarang	<i>L. meyeri</i> , <i>L. biflexa</i>
Shermani	<i>L. noguchii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. inadai</i>
Tarassovi	<i>L. noguchii</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. inadai</i>

Fonte: adaptado de LEVETT (2001)

A reclassificação do gênero *Leptospira* segundo critérios genéticos é taxonomicamente correta, e possui a perspectiva da identificação de novas genomoespécies. Entretanto, há incompatibilidade com a classificação antigênica, uma vez que não há correspondência entre espécies e genomoespécies, fato que dificulta a interpretação dos estudos epidemiológicos (GREENE et al. 2006; LEVETT, 2007). Além disto, deve-se considerar que os testes moleculares ainda não são disponíveis como método de diagnóstico de rotina, o que justifica a manutenção de ambas as classificações (LEVETT, 2001; VINETZ, 2001; McBRIDE et al., 2005). Segundo esta perspectiva, adotou-se uma nomenclatura para diferenciar tais classificações, em que *L. interrogans* sensu lato e *L. biflexa* sensu lato referem-se à classificação sorológica, enquanto *L. interrogans* sensu stricto e *L. biflexa* sensu stricto referem-se à genotípica (LEVETT, 2001; WHO, 2003).

2.2. Epidemiologia

A leptospirose é uma zoonose emergente (McBRIDE et al., 2005; ADLER; MOCTEZUMA, 2009), que acomete o homem e os animais domésticos e silvestres, assumindo considerável importância em termos de saúde pública e problemas econômicos. Presume-se que esta seja a zoonose mais difundida no mundo (WHO, 2003). Sua ocorrência despertou maior atenção a partir da década de 90, do século passado, quando foram registrados surtos de leptospirose humana afetando diferentes populações (VINETZ, 2001).

A transmissão da leptospirose entre humanos contaminados é inexistente (ADLER; MOCTEZUMA, 2009), estando esta relacionada ao contato direto ou indireto com a urina de mamíferos infectados. Desta forma, a epidemiologia da leptospirose humana reflete as relações ecológicas entre os seres humanos e os hospedeiros mamíferos infectados, e o conhecimento sobre a participação dos animais como mantenedores desta enfermidade é de fundamental importância (VINETZ, 2001).

Reconhece-se a possibilidade de que todos os mamíferos possam ser infectados, incluindo mamíferos aquáticos, e funcionarem como reservatórios desta enfermidade, uma vez que esta bactéria foi detectada em todas as

espécies estudadas (ADLER; MOCTEZUMA, 2009). Dentre os hospedeiros de manutenção da leptospirose, os roedores são aqueles mais relacionados com a sua disseminação. Neste sentido, o papel dos roedores como fonte de disseminação da leptospirose foi descoberto desde 1917, por Ido et al., que identificaram a presença da bactéria nos rins e urina destes animais. Naquela oportunidade, os autores recomendaram como medida de controle da leptospirose o extermínio dos roedores.

Além dos roedores, os cães exercem uma elevada importância na epidemiologia da leptospirose por viver em contato com o homem, representando assim o elo de transmissão da enfermidade (LEFEBVRE, 2003).

Além dos animais domésticos, os animais silvestres também podem estar envolvidos no ciclo de transmissão da doença. Em um estudo epidemiológico realizado na Fundação Parque Zoológico de São Paulo, Corrêa et al (2004) analisaram um total de 302 animais silvestres, verificando que 19,5% foram positivos para *Leptospira* spp. através da técnica de soroaglutinação microscópica (SAM). Os sorovares mais encontrados foram copenhageni, pomona e castellanis. No Estado do Tocantins, Souza Junior et al. (2006) investigaram a presença de *Leptospira* sp. em animais silvestres de vida livre, encontrando as seguintes soropositividades: 2,4% em bugio (*Alouatta caraya*), 12,9% em quati (*Nasua nasua*), 16,1% em macaco prego (*Cebus apella*) e 20% em cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*). As sorovarietades mais freqüentemente encontradas foram brasiliensis, fluminense, mangus e javanica. Nessas populações acima citadas, alguns desses sorovares não são comumente encontrados, e a proximidade do homem com essas espécies, pode torná-los vulneráveis a infecção por *L. interrogans*.

Para a compreensão dos aspectos epidemiológicos relacionados à leptospirose, o reconhecimento dos sorovares é de fundamental importância, uma vez que existe relação entre sorovares e espécies de hospedeiro acometidas (HORSH, 1999).

Animais e os seres humanos podem ser divididos como hospedeiro de manutenção ou hospedeiro acidental (incidental) da leptospirose. Hospedeiro de manutenção é definido como espécies em que a infecção é endêmica, e cuja transmissão ocorre pelo contato direto entre animais. Geralmente, a

infecção é adquirida em idade precoce, sendo que a prevalência de excreção crônica de leptospiras na urina aumenta com o avançar da idade do animal (LEVETT, 2001). Outros animais (como os seres humanos) podem infectar-se pelo contato indireto com o hospedeiro de manutenção, tornando-se hospedeiros acidentais. Ressalta-se que uma determinada espécie animal pode constituir-se como hospedeiro de manutenção para alguns sorovares, e hospedeiro acidental para outros (LEVETT, 2001; MOORE et al., 2006).

Do ponto de vista clínico-epidemiológico, um animal que constitui-se como hospedeiro de manutenção de um determinado sorovar, tende a torna-se reservatório deste sorovar; enquanto que nos casos do hospedeiro acidental, este possui maior possibilidade da manifestação clínica da enfermidade (GREENE et al., 2006). Nas duas situações, os animais infectados eliminam as leptospiras pela urina, por um período de semanas a meses, contaminando o ambiente. Entretanto, os hospedeiros de manutenção são os que desempenham maior relevância como fonte de transmissão da leptospirose, pois se atribui a estes a razão da persistência do agente na natureza (HORSH, 1999; WHO, 2003; GREENE et al., 2006).

Neste sentido, os roedores, em especial o rato (*Rattus norvegicus*), são apontados como os hospedeiros de manutenção dos sorovares copenhageni e icterohaemorrhagiae; os cães do sorovar canicola; os bovinos dos sorovares pomona e hardjo; e os suínos dos sorovares pomona e bratislava (CORRÊA; CORRÊA, 1992; BRASIL, 1995; WHO, 2003). É importante ressaltar que existem variações entre os hospedeiros de manutenção em relação à localização geográfica, o que justifica a necessidade de trabalhos epidemiológicos em regiões distintas para que haja uma melhor compreensão desta enfermidade (LEVETT, 2001).

No Brasil e no mundo, vários inquéritos sorológicos utilizando a SAM, retrataram a variabilidade da distribuição dos sorovares de *Leptospira* spp. predominantes nas diferentes localidades, estando estas apresentadas respectivamente nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3 – Inquéritos sorológicos para avaliação de anticorpos anti-leptospira em cães, realizados em diferentes municípios no Brasil

Local de estudo	População de estudo	Prevalência na SAM	Sorovares mais prevalentes	Autores
Pelotas, RS	425 cães errantes	34,8%	Canicola, icterohaemorrhagiae, copenhageni	Ávila et al. (1998)
Pelotas, RS	489* cães domiciliados	2,66%	Icterohaemorrhagiae, australis, copenhageni, pyrogenes, sentot e canicola	Jouglard e Brod (2000)
Salvador, BA	120 cães errantes	85%	Autumnalis, canicola, icterohaemorrhagiae, australis, pyrogenes, castellanis, tarassovi	Viegas et al. (2001)
Santana do Parnaíba, SP	410** cães domiciliados	15%	Copenhageni, canicola, hardjo	Mascolli et al. (2002)
Patos, PB	130 cães errantes	20%	Autumnalis, pomona, grippotyphosa e patoc	Batista et al. (2004)
Campina Grande, PB	285** cães domiciliados	21,4%	Autumnalis, copenhageni e canicola	Batista et al. (2005)
Itapema, SC	590 cães errantes	10,5%	Pyrogenes, canicola, icterohaemorrhagiae e copenhageni	Blazius et al. (2005)
Belo Horizonte, MG	3417 cães errantes	13,1%	Canicola, ballum, pyrogenes e icterohaemorrhagiae.	Magalhães et al. (2006)
Botucatu, SP	775** cães domiciliados	15,3%	Canicola e pyrogenes	Modolo et al. (2006)
Monte Negro, RO	329 cães domiciliados – 156** e 173*	27,3%	Pyrogenes, autumnalis, shermani, hardjo	Aguiar et al. (2007)
Curitiba, PR	598** cães domiciliados	32,27%	Copenhageni, canicola e icterohaemorrhagiae	Tesseroli et al. (2008)

*zona rural;**zona urbana; ponto de corte considerado $\geq 1:100$.

Tabela 4- Inquéritos sorológicos para avaliação de anticorpos anti-leptospira em cães, realizados em diferentes países

Local de estudo	População de estudo	Prevalência na SAM	Ponto de corte	Sorovares mais prevalentes	Autores
Ontário, Canadá	462 cães suspeitos entre 1998 e 2001	26,2% em 1998 14,8% em 1999 41,2 % em 2000 17,4% em 2001	≥320	Autumnalis, Bratislava, Canicola, Grippothyphosa e Pomona.	Prescott et al. (2002)
Ankara, Turkey	116 cães errantes	43,96%	≥1:100	Grippothyphosa, Icterohaemorrhagiae, Bratislava, Pomona, Canicola	Aslantas et al. (2005)
Trindade, Venezuela	419 ^{**} cães suspeitos e saudáveis	14,6%	≥1:100	Mankarso, Icterohaemorrhagiae, Autumnalis e Copenhageni.	Adesiyun et al. (2006)
Madras, Índia	77 cães suspeitos	57,7%	-	Australis, Grippotyphosa, Javanica	Senthilkumar et al. (2006)
Munique, Alemanha	316 cães suspeitos	13%	>1:100	Grippotyphosa, Saxkoebing Icterohaemorrhagiae Canicola e Bratislava	Gesen et al. (2007)
Chennai, Índia	48 cães suspeitos	62,5%	≥1:100	Australis, Canicola, Javanica, Hebdomadis,	Vijayanand et al. (2008)
Yucatã, México	400 cães errantes	35%	≥1:100	Canicola, Icterohaemorrhagiae, Panama e Pyrogenes	Jimenez-Coello et al. (2008)

*zona rural;**zona urbana

2.3. Patogenia

As leptospiros penetram ativamente no organismo hospedeiro por meio de pequenas lesões ou abrasões na pele, via membranas mucosas, como conjuntiva oral, nasal e genital, ou pela pele úmida íntegra (LEFEBVRE, 2003; GREENE et al., 2006). Durante o período aproximado de sete dias, ocorre circulação das bactérias na corrente sanguínea, denominada como fase de leptospiremia, onde se multiplicam e se disseminam por todo organismo. Quando o número de leptospiros atinge níveis críticos na circulação e nos órgãos, estas produzem lesões tóxicas e degenerativas, acarretando nos sinais clínicos. Como lesões primárias ocorrem danos no endotélio vascular, conduzindo à hemorragia e isquemia dos órgãos, resultando em necrose tubular renal, em danos hepatocelular e pulmonar, em meningite, miosite, dentre outros (ADLER; MOCTEZUMA, 2009). Todos os sorovares de *Leptospira* spp. podem produzir tais alterações em graus variados (LEFEBVRE, 2003).

Com o fim da fase de leptospiremia, as leptospiros são eliminadas do organismo, coincidindo com o aparecimento de anticorpos e o início da fase imune. Neste caso, a resposta humoral é o principal mecanismo de defesa contra a leptospirose (LEVETT, 2001). Anticorpos da classe IgM geralmente aparecem um pouco mais cedo do que anticorpos IgG, e geralmente permanecem detectáveis por meses ou mesmo anos, mas em baixos títulos. A detecção de anticorpos da classe IgG é mais variável, podendo ser detectado ou não (WHO, 2003). Essas imunoglobulinas irão provocar a lise e opsonização das leptospiros circulantes, para que sejam fagocitadas por macrófagos, resultando assim na remissão dos sinais clínicos. Contudo, o agente persiste nos rins e trato reprodutivo, estado de portador renal, podendo ser eliminado na urina por vários meses após a infecção, o que corresponde à fase de leptospirúria (BOLIN, 2000).

O estado de portador renal é, portanto, um componente fundamental para a persistência da leptospirose no ambiente. Ressalta-se que o pH urinário constitui-se como um fator importante para a viabilidade da leptospira, sendo o pH alcalino favorecedor enquanto pH ácidos são limitantes.

Conseqüentemente, os herbívoros e os animais cuja dieta produz urina alcalina são relativamente mais importantes como disseminadores da leptospirose (ADLER; MOCTEZUMA, 2009), que o homem que possui urina ácida (LEVETT, 2001).

2.4. Diagnóstico

O diagnóstico de leptospirose é normalmente realizado pela determinação da presença do agente etiológico ou de anticorpos humorais induzidos pelo mesmo. A demonstração do agente etiológico pode ser estabelecida por métodos de visualização (exame a fresco em campo escuro, coloração pela prata, imunofluorescência direta, provas sorológicas), por métodos de cultivo, por inoculação em animais de laboratório (hamster), e pela demonstração do ácido nucléico do agente infeccioso pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (WHO, 2003; OOTEMAN et al., 2005).

2.4.1. Visualização microscópica

As leptospirosas presentes em fluidos como sangue, urina, fluido cerebroespinal e líquido peritoneal, podem ser visualizadas em microscópio de campo escuro. No entanto, esta técnica apresenta pouca sensibilidade e especificidade. Isso porque é necessário 10^4 leptospirosas por mL para que seja possível a visualização (VIJAYACHARI et al., 2001). Além disso, outras espiroquetas podem estar presentes no material analisado, resultando em diagnóstico falso positivo. Deve-se considerar ainda que a visualização da leptospirosas não signifique, necessariamente, que esta seja responsável pelo desencadeamento do quadro clínico no indivíduo (WHO, 2003).

Além da visualização da leptospirosas em fluidos, é possível a sua pesquisa em tecidos, sendo rins, fígado e pulmões aqueles mais adequados para esta visualização. Neste caso, deve-se empregar técnicas de coloração especiais, como impregnação pela prata, corantes de imunohistoquímica ou métodos de anticorpos fluorescentes (QUINN et al., 2005).

2.4.2. Isolamento e identificação de *Leptospira* spp.

O diagnóstico definitivo de *Leptospira* spp. pode ser feito pelo isolamento e cultivo do agente infeccioso. Porém, o período necessário para obtenção do resultado pode variar entre sete dias a várias semanas, sendo influenciado pelo sorovar infectante e pelo número inicial de bactérias viáveis (SILVA et al., 2007). O cultivo desta bactéria possui como limitações a complexidade dos meios de cultura, a necessidade de semear o material imediatamente após a coleta, o longo tempo de geração da espiroqueta e, finalmente, a dificuldade encontrada pelos laboratórios em obter a amostra livre de contaminantes. Além disso, o isolamento e identificação da *Leptospira* spp. consomem muito tempo e necessitam de laboratórios de referência especializados (FREITAS et al., 2004).

O crescimento de *Leptospira* spp. é freqüentemente lento no primeiro isolamento, podendo durar o período de até 13 semanas. Os meios líquidos mais utilizados para o cultivo são o de Stuart e semi-sólido de Fletcher, ambos contendo soro de coelho, ou, ainda, o meio EMJH (Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris), contendo albumina e ácidos graxos (QUINN et al., 2005). Também pode ser empregado o meio Tween 80/40/LH (FREITAS et al., 2004).

O isolamento da *Leptospira* spp. em animais de laboratório não oferece tantas vantagens como em meios de cultivo. No entanto, quando alguma cepa não se adapta bem aos meios de cultura, esse método é considerado eficaz. Neste caso, os animais mais usados para esta finalidade são as cobaias e os hamsters (LOMAR et al., 2000).

2.4.3. Diagnóstico sorológico

A maioria dos casos de leptospirose é diagnosticada pela sorologia. Os métodos sorológicos podem ser divididos em dois grupos, um gênero-específico e outro sorogrupo-específico (LEVETT, 2004).

Diversas provas sorológicas podem ser utilizadas como a reação de SAM, reação de soroaglutinação macroscópica, reação de fixação de complemento, reação de hemaglutinação em látex, reação de contra-

imunoeletroforese, reação de imunofluorescência, ensaio imunoenzimático e radioimunoensaio. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a reação de SAM é o teste de referência e constitui-se como prova “padrão-ouro” para o diagnóstico da leptospirose humana e animal, devido a sua elevada especificidade (sorovar/sorogrupo) (WHO, 2003).

2.4.3.1 SAM

A técnica da SAM baseia-se na adição de soro suspeito em diluições crescentes a culturas de diversos sorovares de *Leptospira* spp., e sua aglutinação é observada em microscópio de campo escuro. Tendo em vista que esta técnica fundamenta-se na presença de anticorpos, sua sensibilidade é baixa na fase aguda da doença, sendo que os níveis de anticorpos na corrente sanguínea são detectados apenas 7 a 10 após o início dos sinais clínicos (LEVETT, 2003).

Os anticorpos aglutinantes podem ser tanto da classe IgM quanto IgG. As IgM associam-se com exposições recentes, e embora tenham maior poder aglutinante do que as IgG, seus títulos se reduzem em até 7 dias após a exposição. Sendo assim, normalmente apenas as IgG são detectadas na SAM, podendo estas persistirem por períodos prolongados (WHO, 2003).

A SAM fornece um resultado sorogrupo-específico, e sua interpretação é complexa devido às reações cruzadas que ocorrem entre sorogrupos distintos, principalmente na fase aguda da doença (McBRIDE et al., 2005). Além dessas reações cruzadas, muitos indivíduos infectados são assintomáticos, não apresentando qualquer sintoma clínico para a doença, mesmo que produzam anticorpos (LEVETT, 2003). A interpretação desses resultados torna-se ainda mais complicada, se os indivíduos tiverem sido previamente vacinados ou forem oriundos de regiões endêmicas para a doença (BAJANI et al., 2003).

Outra desvantagem da técnica refere-se a sua realização. Apenas laboratórios especializados e com pessoal devidamente treinado pode realizar o teste. A manutenção de uma grande quantidade de antígenos vivos no laboratório é uma tarefa bastante laboriosa e requer cuidados especiais. É necessário que as culturas vivas sejam subcultivadas semanalmente, e as cepas utilizadas checadas periodicamente para que não ocorra contaminação

cruzada. Além disso, o resultado do teste pode ser afetado pela qualidade do meio de cultura utilizado, e pela experiência do técnico operador (LEVETT, 2001).

Em investigações soro-epidemiológicas, a SAM é considerado o teste mais apropriado. Isso porque a técnica não apresenta limitação quando aplicado a soro de diferentes espécies de animais. Além disso, pode-se incluir ou excluir antígenos quando necessário. Neste caso, os resultados encontrados servirão para dar uma visão geral sobre os sorogrupos que estão presentes em uma determinada população (LEVETT, 2004). No entanto, é preciso considerar que resultados dependem da escolha dos antígenos (sorogrupos) a serem testados, sendo possível a ocorrência de resultados falso-negativos em decorrência da não inclusão de um antígeno adequado (WHO, 2003).

2.4.4. Diagnóstico molecular

Nos últimos anos, a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) tornou-se uma importante ferramenta na detecção de agentes patogênicos em várias espécies de animais (OLIVEIRA et al., 2007; MAGAJEVSKI; GÍRIO, 2008). Esta técnica apresenta alta sensibilidade e especificidade, permitindo amplificar quantidades mínimas do DNA do microorganismo em diversos tipos de amostras biológicas tais como humor aquoso, urina, soro, líquido cefalorraquidiano e tecidos (WHO, 2003).

O método consiste na amplificação exponencial *in vitro* de regiões específicas de DNA em um curto espaço de tempo. Cada ciclo consiste de três fases: 1- desnaturação das fitas de DNA; 2- anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores específicos ao DNA molde; 3- síntese do DNA específico utilizando a enzima taq DNA polimerase. As moléculas amplificadas pela técnica da PCR são facilmente detectadas e identificadas pela eletroforese (BELAK; BALLAGI-PORDÁNY, 1993).

Desde 1990, vários protocolos de PCR foram desenvolvidos para detecção do DNA da *Leptospira* em amostras clínicas, sendo que a maior parte deles relatou alta sensibilidade nesta detecção. Como já referido, esta técnica

identifica genomoespécies, podendo estas serem patogênicas ou saprófitas (MAJED et al., 2005; AHMED et al., 2006; ADLER; MOCTEZUMA, 2009).

Este tipo de diagnóstico, embora sensível, é restrito a alguns laboratórios de referência, pois exige mão-de-obra altamente especializada e infra-estrutura laboratorial onerosa, além de frequentemente sofrer a interferência de contaminantes e inibidores provenientes da amostra (WHO, 2003).

2.5. Utilização de sistemas de informação geográfica em epidemiologia

Saúde Pública e ambiente são intrinsecamente influenciadas pelos padrões de ocupação do espaço. Suas relações podem ser evidenciadas pela análise de características epidemiológicas das áreas próximas às fontes de contaminação e pela identificação de fatores ambientais adversos em locais onde há concentração de agravos à saúde (PINA; SANTOS, 2000). Com o avanço dos recursos computacionais e a adoção de técnicas de geoprocessamento, os estudos da relação entre o espaço e o processo saúde-doença assumiram considerável relevância na tomada de decisão em saúde pública (MEDRONHO; WERNECK, 2002).

O sistema de informação geográfica (SIG) constitui um conjunto de dados ou base de dados geográficos obtidos por meio de geoprocessamento, sensoriamento remoto ou cartografia digital. Esses dados podem ser espaciais ou de atributos (PINA; SANTOS, 2000). Os dados espaciais (ou geográficos ou de localização) consistem em objetos gráficos do mapa (limites políticos, territórios, entre outros). Já os dados de atributos são as variáveis descritivas que caracterizam ou se relacionam com a base geográfica (perfil socioeconômico, o tipo de clima, o tipo de vegetação, a taxa de mortalidade, entre outros). A integração desses dados tornou possível uma melhor caracterização e análise de dados espaciais, constituindo-se numa ferramenta indispensável no processo de gestão dos riscos e planejamento em saúde (BARCELLOS et al., 2008).

Com esta interação, surgiu o conceito de epidemiologia geográfica, que corresponde ao estudo da distribuição geográfica da incidência de doenças e de sua relação com fatores de risco potenciais. A epidemiologia geográfica tem

quatro grandes áreas de interesse: mapeamento de doenças, estudos ecológicos, estudos de agregados (cluster) e avaliação e vigilância ambiental, o que constitui um terreno promissor para a aplicação e desenvolvimento de métodos e modelos estatísticos (BAILEY, 2001). A inclusão, aplicação e o desenvolvimento do processamento e análise automatizada de bases de dados georreferenciadas tendem a aprimorar a compreensão do espaço na produção e disseminação de doenças e agravos à saúde (PIETRI et al., 2008).

Alguns exemplos da aplicação de SIG podem ser observados tanto em saúde pública quanto em saúde animal. No Brasil, Barcellos e Sabroza (2000) utilizaram um SIG para estudar o contexto da ocorrência da leptospirose humana, durante o verão de 1996, na região oeste do Rio de Janeiro. Eles constataram importantes diferenças entre os locais de ocorrência da enfermidade, relacionando a maioria dos casos aos locais próximos às regiões com água parada, entulhos de lixo e redes de esgotos. A influência desses fatores foi nitidamente observada quando a moradia da maioria dos doentes localiza-se a menos de 100 metros das referidas variáveis, fato esse possível de ser observado pelo SIG. Esses dados contribuíram para medidas, como limpeza da área e implementação de ações sanitárias naquela região, visando à diminuição da re-infecção dos moradores.

Barcellos et al. (2003) realizaram uma análise retrospectiva de 1274 casos registrados de leptospirose humana no Estado do Rio Grande do Sul em 2001, utilizando recursos de geoprocessamento. Mapas georreferenciados dos municípios foram sobrepostos aos de uso do solo, relevo e bacias hidrográficas. Com as operações de geoprocessamento, foram verificadas que as maiores taxas da doença ocorreram em áreas litorâneas, de baixa altitude e de uso do solo predominantemente agrícola. Os resultados sugeriram a existência de características ecológicas favoráveis à transmissão da leptospirose tais como a produção agrícola intensiva e uma maior proliferação de roedores sinantrópicos. Mas verificaram também que o uso de municípios como unidades de agregação de dados tendeu a valorizar fatores locais em detrimento de macrocomponentes ecológicos. Sugerindo assim, que a abordagem ecossistêmica da saúde pública carece de desenvolvimento de metodologias capazes de identificar e agir sobre os determinantes ambientais.

Silva et al. (2006) estabeleceram a distribuição espacial da leptospirose canina na cidade de Botucatu, São Paulo. Durante a campanha de vacinação anti-rábica, foram colhidas 1000 amostras de sangue de cães, em 20 postos, distribuídos homoganeamente. Análises espaciais foram realizadas pelo programa SaTScan, procurando-se um conglomerado mais provável. Observaram que o conglomerado formado não tinha associação com características ambientais, mas condições distintas do local. Neste caso, as técnicas de geoprocessamento e análise estatística espacial ajudaram a compreender melhor a distribuição dos resultados sorológicos, na cidade, e identificar os fatores de risco mais importantes tais como idade e manejo da criação dos cães.

Na Tailândia, Herbreteau et al. (2006) avaliaram a influência do meio ambiente na incidência da leptospirose humana em áreas rurais da província de Phrae. O mapeamento dos casos da doença com o auxílio do sistema de posicionamento global (GPS), juntamente com imagens de satélite da área, permitiram uma melhor caracterização dos locais onde ocorreram os agravos. No entanto, não foi verificada correlação entre o ambiente e os casos de leptospirose notificados. Os autores citaram que a importância da análise dos fatores de risco para a leptospirose não pode ser avaliada apenas pela relação com atividades ocupacionais, mas também por fatores que podem intervir na infecção por *Leptospira* spp., tais como o uso de equipamentos de proteção (luvas e botas), presença de feridas, presença ou contato estreito com roedores.

Nos Estados Unidos, Ghneim et al. (2007) utilizaram um SIG para investigar quais aspectos da paisagem e padrões de ocupação da terra são importantes na transmissão da leptospirose canina. Níveis de influência espacial foram analisados por meio de cálculos da densidade hidrológica e da porcentagem de ocupação da área. Sob análise espacial, a longitude teve correlação positiva com o aparecimento da doença, mas esta característica estava associada com a proximidade do Oceano Pacífico. Verificaram assim que as análises espaciais só foram significativas quando associadas às análises epidemiológicas.

Verifica-se, desse modo, que cada vez mais o SIG e tecnologias relacionadas com o geoprocessamento estão sendo utilizadas para analisar as

relações entre os fatores epidemiológicos (agentes, vetores, hospedeiros e pessoas) e seus ambientes geográficos. Identificando e tipificando os problemas e as necessidades em saúde. Além disso, a redução nos custos e a maior acessibilidade à informática são fatores que contribuíram para a aplicação do uso dessas tecnologias pelos epidemiologistas (CORREIA et al., 2004).

A concepção de espaço necessitou acompanhar o dinamismo do processo saúde-doença das populações. Com isso foi estabelecida uma interlocução entre a epidemiologia e a geografia. Compreender a organização do espaço possibilita maior aproximação dos fatores relacionados ao desenvolvimento das doenças e da sua distribuição entre os diversos grupos sociais. As desigualdades espaciais precisam ser identificadas para que se possa qualificar e organizar os serviços de saúde de acordo com as particularidades de cada área geográfica. Certamente, o desafio atual para a epidemiologia é desenvolver trabalhos centrados na perspectiva da valorização do espaço, explorando as potencialidades de métodos inovadores do ponto de vista das intervenções em saúde pública (BONFIM; MEDEIROS, 2008).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADESIYUN, A.A. et al. Sero-epidemiology of canine leptospirosis in Trinidad: serovars, implications for vaccination and public health. **Journal of Veterinary Medicine B**, v.53, p.91-99, 2006.

ADLER, B.; MOCTEZUMA, A.P. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary microbiology**, 2009. Doi: 10.1016/j.vetmic.2009.03.012.

AGUIAR, D.M. et al. Fatores de risco associados a ocorrência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em cães do município de Monte Negro, Rondônia, Amazônia Ocidental Brasileira. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.1, p.70-76, 2007.

AHMED, N et al. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v.5, p.1-10, 2006.

ASLANTAS, O. et al. Seroepidemiology of leptospirosis, toxoplasmosis and leishmaniosis among dogs in Ankara, Turkey. **Veterinary parasitology**, v.129, p.187-191, 2005.

ÁVILA, M.O. et al. Aglutininas anti-leptospiricas em cães na área de influência do centro de controle de zoonoses, Pelotas, RS, Brasil, no ano de 1995. **Ciência Rural**, v.28, n.1, p.107-110, 1998.

BAILEY, T.C. Spatial statistical methods in health. **Cadernos de Saúde Pública**, v.17, n.5, p.1083-1098, 2001.

BAJANI, M.D et al. Evaluation of four commercially available rapid serologic tests for diagnosis of leptospirosis. **Journal of clinical microbiology**, v.41, p.803-809, 2003.

BARCELLOS, C.; SABROZA, P.C. Socio-environmental determinants of the leptospirosis outbreak of 1996 in western Rio de Janeiro: a geographical approach. **International Journal of Environmental Health Research**, v.10, p. 301–313, 2000.

BARCELLOS, C. et al. Distribuição espacial da leptospirose no Rio Grande do Sul, Brasil: recuperando a ecologia dos estudos ecológicos. **Cadernos de Saúde pública**, v.19, n.5, p.1283-1292, set./out., 2003.

BARCELLOS, C. R. et al. Georreferenciamento de dados de saúde na escala submunicipal: algumas experiências no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.17, p.1, p. 59-70, 2008.

BATISTA, C.S.A. et al. Soroprevalência de leptospirose em cães errantes da cidade de Patos, Estado da Paraíba, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.41, n.2, 2004.

BATISTA, C.S.A. et al. Soroprevalência e fatores de risco para a leptospirose em cães de Campina Grande, Paraíba. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, p.179-185, 2005.

BELAK, S.; BALLAGI-PORDANY, A. Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic. **Veterinary Research Communications**, v.17, n.1, p.55-72, 1993.

BLAZIUS, R.D. et al. Ocorrência de cães errantes soropositivos para *Leptospira* spp. na cidade de Itapema, Santa Catarina, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.21, n.6, p.1952-1956, 2005.

BOLIN, C. Leptospirosis. In: Brown, C. and Bolin, C. **Emerging diseases of animals**. Washington: ASM Press, 2000. p. 185-200.

BONFIM, C.; MEDEIROS, Z. Epidemiologia e geografia: dos primórdios ao geoprocessamento. **Revista Espaço para a saúde**, v.10, n.1., p.53-62, 2008.

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

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Casos confirmados de leptospirose Brasil, grandes regiões e unidades federadas**. 2008. Disponível em: <http://docs.google.com/gview?a=v&q=cache:xXX65Tm_tAcJ:portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tab2972008lepto.pdf+leptospirose+2009&hl=pt-BR&sig=AFQjCNGEejrkbaQdGwgoCbDNjsPNWGe9nQ>. Acesso em 8 out. 2009.

BROD, C.S.et al. Evidência do cão como reservatório da leptospirose humana: isolamento de um sorovar, caracterização molecular e utilização em inquérito sorológico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.38, p.294-300, 2005.

CÉSPEDES, M.Z. et al. Leptospirosis: una enfermedad zoonótica hiperendémica en la provincial de Coronel Portillo. Ucayali, Perú. **Revista Peruana de Medicina experimental de Salud publica**, v.21, p.62-70, 2004.

CORRÊA, S.H.P. et al. Epidemiologia da leptospirose em animais silvestres na Fundação Parque Zoológico de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Animal Science**, v.41, p.189-193, 2004.

CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C. N.M. **Enfermidades infecciosas de animais domésticos**. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992, 843 p.

CORREIA, V.R.M. et al. Remote sensing as a tool to survey endemic diseases in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.20, n.4, p.891-904, 2004.

FARIA, M.T. et al. Carriage of *Leptospira interrogans* domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. **Acta tropica**, v.108, p.1-5, 2008.

FREITAS, J.C. et al. Isolation of *Leptospira* spp from dogs, bovine and swine naturally infected. **Ciência rural**, v.34, n.3, 2004. Doi: 10.1590/S0103-84782004000300030.

GESEN, V. et al. Canine leptospirosis infectious – clinical signs and outcome with different suspected *Leptospira* serogroups (42 cases). **Journal of Small Animal Practice**, v.48, p. 324-328, 2007.

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. **Veterinary Research**, v.38, p.37-50, 2007.

GÓNGORA, A. et al. Seroprevalencia de *Leptospira* spp. en Grupos de Población de Villavicencio, Colômbia. **Revista de Salud Publica**, v.10, p.269-278, 2008.

GREENE, C.E. et al. Leptospirosis. In: GREENE,C.E. **Infectious disease of the dog and cat**. 3^a ed. Saunders. 2006. Cap.44, p.402-417.

HERBRETEAU; V. et al. Use of geographic information system and remote sensing for assessing environment influence on leptospirosis incidence, Phrae province, Thailand. **International Journal of Geoinformatics**, v.2, n.4, p. 43-50, 2006.

HORSCH, F. Leptospirose. In: BEER, J. **Doenças infecciosas em Animais Domésticos**. São Paulo: Roca, 1999. Cap.53, p.303-322.

IDO, Y. et al. The rat as a carrier of *Spirochaeta icterohaemorrhagiae*, the causative agent of Weil's disease (Spirochetosis icterohaemorrhagica). **The Journal of experimental medicine**, v.26, p.341-353, 1917.

JIMENEZ-COELLO, M. et al. Serological survey of canine leptospirosis in the tropics of Yucatan Mexico using two different tests. **Acta Tropica**, v.106, p.22-26, 2008.

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

LEFEBVRE, R.B. Leptospiras. **Microbiologia Veterinária**. In: HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. Cap.34, p.174-177.

LEVETT, P.N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, p. 296–326, 2001.

LEVETT, P.N. Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. **Clinical Infectious Diseases**, v.36, p.447-452, 2003.

LEVETT, P.N. Leptospirosis: A forgotten zoonosis? **Clinical and Applied Immunology Reviews**, v.4, p.435–448, 2004.

LEVETT, P.N. Sequence-based typing of *Leptospira*: epidemiology in the genomic era. **Plos Neglected tropical diseases**, v1, p. 1-2, 2007.

LOMAR, A.V. et al. Leptospirosis in Latin America. **Infectious Disease Clinics of North America**, v.14, n.1, p.23-39, 2000.

MACIEL, E.A.P. et al. Household transmission of *Leptospira* infection in urban slum communities. **Plos Neglected Tropical Disease**. Doi:10.1371/journal.pntd.0000154. 2008.

MAGAJEVSKI, F.S.; GÍRIO, R..J.S. Avaliação da sensibilidade da PCR frente a quatro técnicas para extração de DNA de *Leptospira interrogans* sorovar pomona em sêmen bovino experimentalmente contaminado. **ARS Veterinaria**, v.24, n.1, p.29-33, 2008.

MAGALHÃES, D.F. et al. Prevalência de aglutininas anti-*Leptospira interrogans* em cães de Belo Horizonte, Minas Gerais, 2001 a 2002. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.2, p.167-174, 2006.

MAJED, Z. et al. Identification of Variable-Number Tandem-Repeat Loci in *Leptospira interrogans* Sensu Stricto. **Journal of clinical Microbiology**, v.43, p. 539–545, 2005.

MASCOLLI, R. et al. Inquérito sorológico para leptospirose em cães do município de Santana de Parnaíba, São Paulo, utilizando a campanha de vacinação anti-rábica do ano de 1999. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.69, p.25-32, 2002.

McBRIDE, A. et al. Leptospirosis. **Current opinion in infection diseases**, v.18, p.376-386, 2005.

MEDRONHO, R.A.; WERNECK, G.L. Técnicas de análise espacial em saúde. In: MEDRONHO, R.A. (org.). **Epidemiologia**. São Paulo: Ed. Ateneu, 2002, p.427-436.

MODOLO, J.R. et al. Investigação soropidemiológica de leptospirose canina na área territorial urbana de Botucatu, São Paulo, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.43, p.598-604, 2006.

MOORE, G.E. et al. Canine leptospirosis, United States, 2002-2004. **Emerging Infectious diseases**, v.12, n.3, p.501-503, 2006.

NARITA, M., et al. Leptospirosis after recreational exposure to water in the Yaeyama Islands, Japan. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.73, p.652-656, 2005.

OLIVEIRA, S.J. et al. Molecular diagnosis of *Leptospira* spp in culled sows. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.44, n.1, p.18-23, 2007.

OOTEMAN, M.C. et al. Evaluation of MAT, IgM ELISA and PCR methods for the diagnosis of human leptospirosis. **Journal of Microbiological Methods**, v.65, p.247-257, 2005.

PIETRI, D.E.; GARCIA, S.; RICO, O. Geospatial models for local health surveillance. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v.23, n.6, p.394-402, 2008.

PINA, M.F.; SANTOS, S.M. **Conceitos básicos de Sistemas de Informação Geográfica e Cartografia aplicados à saúde**. 20 ed. Brasília: OPAS, 2000. 122 p.

PRESCOTT, J.F. et al. Resurgence of leptospirosis in dogs in Ontario: recent findings. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 43, p.955-961, 2002.

REIS, R.B. et al. Impact of environmental and social gradient on *Leptospira* infection in urban slums. **PLoS Neglected Tropical Disease**. Doi:10.1371/journal.pntd.0000228. 2008.

QUINN, P.J. et al. Espiroquetas. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. In: Q QUINN, P.J. Porto Alegre: Artmed, 2005. Cap.31, p.179-183.

RUSSEL, K.L. et al. An outbreak of leptospirosis among peruvian military recruits. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.69, p.53-57, 2003.

SENTHILKUMAR, A. et al. Sero diagnosis of canine leptospirosis. **Tamilnadu Journal of veterinary and animal sciences**, v.2, n.6, p.251-254, Nov./dez., 2006.

SILVA, W.B. et al. Avaliação de fatores de risco de cães sororreagentes à *Leptospira* spp. e sua distribuição espacial, em área territorial urbana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.43, n.6, p.783-792, 2006.

SILVA, É. F. et al. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. **Vaccine**, 25, p. 6277-6286, 2007.

SOUZA JUNIOR, M.F. et al. A presença de anticorpos da classe IgM de *Leptospira interrogans* em animais silvestres do Estado do Tocantins, 2002. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, n.3, p.292-294, maio/jun., 2006.

TASSINARI, W.S. et al. Detection and modelling of case clusters for urban leptospirosis. **Tropical Medicine & International Health**, v.13, p.503-512, 2008.

TESSEROLI, G.L. et al. Principais sorovares de leptospirose canina em Curitiba, Paraná. **PUBVET**, v.2, n.1, art # 239, mai4, 2008. Disponível em: <<http://www.pubvet.com.br/texto.php?id+239>>. Acesso em: 28 fev. 2009.

VIEGAS, S.A.R de A. et al. Investigação sorológica em cães errantes na cidade de Salvador – Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção animal**, v.2, n.1, p.21-30, 2001.

VIJAYACHARI, P. et al. Evaluation of darkground microscopy as a rapid diagnostic procedure in leptospirosis. **Indian Journal of Medical Research**, v.114, p.54-58, 2001.

VIJAYACHARI, P. et al. Leptospirosis: an emerging global public health problem. **Journal of Biosciences**, v.33, n.4, p.557–569, 2008.

VIJAYANAND, V. et al. Serological evidence of leptospiral antibodies in dogs in peripheral areas around Chennai. **Tamilnadu Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v.4, n.4, p.154-155, jul./ago., 2008.

VINETZ, J.M. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.14, p.527-538, 2001.

WATSON, J.T. et al. Epidemics after natural disasters. **Emerging Infectious Disease**, v.13, p.1-5, 2007.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **Human leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control**. 2003. Disponível em:

http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.23.pdf.

Acesso em: 20 set. 2007.

1 **Seroprevalência, fatores de risco e distribuição espacial de anticorpos anti-**
2 ***Leptospira* spp. em cães do município de Ilhéus, Bahia, Brasil***

3 *Seroprevalence, risk factors and spatial distribution of antibody anti-Leptospira in*
4 *dogs on the city of Ilhéus, Bahia, Brazil **

5

6 Manuella de Oliveira Lavinsky¹, Roueda Abou Said^{1**}, Gil Marcelo Reuss Strenzel¹,
7 Helio Langoni²

8

9 ¹ Universidade Estadual de Santa Cruz, Departamento de Ciências Agrárias e
10 Ambientais, Ilhéus, Bahia, Brasil.

11 ² Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho Faculdade de Medicina
12 Veterinária e Zootecnia, Botucatu, São Paulo, Brasil.

13

14

15 **Autor para correspondência:

16 Roueda Abou Said, Dra.

17 Universidade Estadual de Santa Cruz, Rod. Ilhéus/Itabuna, km 16, Departamento de

18 Ciências Agrárias e Ambientais

19 45662 - 900, Ilhéus, Bahia, Brasil

20 Phone: + 55 - 73 - 36805406

21 E-mail: roueda@uol.com.br

22 **Resumo**

23 Neste estudo, objetivou-se determinar a prevalência de anticorpos anti-*Leptospira*
24 spp. em cães domiciliados da zona urbana do município de Ilhéus, Bahia, Brasil,
25 mediante a utilização do teste de soroaglutinação microscópica (SAM), com
26 pesquisa de 24 sorovares. Além disso, realizou-se análise dos fatores de risco e
27 utilizou-se um sistema de informação geográfica (SIG), para investigar quais
28 aspectos da paisagem e padrões de ocupação do espaço influenciariam nesta
29 soropositividade. Foram selecionados 72 pontos de amostragem, distribuídos
30 aleatoriamente pelo programa ArcGis. Em cada ponto, foram colhidas amostras de 4
31 cães distintos, totalizando 282 amostras. Obteve-se 7,1% de prevalência nesta
32 população, sendo que dos 72 pontos de amostragem, 15 pontos apresentaram ao
33 menos um animal reagente ao teste, e em nenhum ponto foi observado 100% de
34 positividade. Dos sorovares testados, o sorovar Copenhageni foi o mais prevalente,
35 seguido pelos sorovares Bratislava, Canicola, Gryppotyphosa e Patoc, e os títulos de
36 anticorpos aglutinantes variaram entre 1:100 e 1:800. Analisando-se os fatores de
37 risco por ponto de amostragem, foram significativas pelo teste do qui-quadrado ($P \leq$
38 0,05) as variáveis não-vacinação, período prolongado de exposição dos alimentos
39 do cão no ambiente, hábito de caça, presença de roedores, proximidade das
40 residências com esgoto a céu aberto e proximidade das residências com terrenos
41 baldios. Não foi detectado nenhum agrupamento espacial significativo. A despeito da
42 baixa prevalência encontrada nesse estudo, é importante ressaltar que diversos
43 fatores de risco associados à leptospirose estão presentes no local estudado, como
44 alta temperatura, umidade, presença de animais domésticos e silvestres, e baixa
45 condição de saneamento básico. Tal fato aponta para a possibilidade de que outros
46 fatores de risco, ainda não estudados, participem da epidemiologia desta doença, o

47 que justificaria esta prevalência. O conhecimento dos sorovares envolvidos, bem
48 como de sua distribuição espacial neste município, auxiliam na compreensão da
49 epidemiologia desta enfermidade e no estabelecimento de políticas de saúde pública
50 que visem o seu controle.

51 Palavras-chaves: SIG, epidemiologia, zoonose.

52 Abstract

53 This study aimed to determine the prevalence of anti-*Leptospira* spp. in dogs' house
54 living in the urban area on the city of Ilhéus, Bahia, Brazil, using the microscopic
55 agglutination test (MAT), with a survey of 24 serovars. In addition, the risk factors
56 were analyzed and geographic information systems (GIS) were used to investigate
57 which environment aspects and patterns of space occupation influence in
58 seropositivity. It were selected 72 sampling points, randomly assigned to the ArcGIS
59 program. At each point, samples were taken from 4 different dogs, totaling 282
60 samples. The prevalence in this population was 7,1%, and at the 72 sampling points,
61 15 points had at least one animal reagent, and at no point was found 100% positivity.
62 Of the serovars tested, Copenhageni was the most prevalent, followed by Bratislava,
63 Canicola, Gryppotyphosa, and the agglutination titers ranged between 1:100 and
64 1:800. Analyzing the risk factors for point sampling were significant by chi-square test
65 ($P \leq 0.05$) the variables non-vaccination, prolonged exposure of dog food in the
66 environment, hunting habit, presence of rodents; proximity of residences with open
67 sewers, and proximity of residences with vacant lots. No significant spatial
68 distribution was detected. Despite the low prevalence found in this study, it is
69 important to note that several risk factors associated with leptospirosis are present in
70 the studied area, such as high temperature, humidity, presence of domestic and wild
71 animals, and poor sanitary condition. This fact points to the possibility that other risk
72 factors not yet studied, participate in the epidemiology of this disease, which would
73 justify this prevalence. The recognized of the serovars of *Leptospira* spp. and their
74 spatial distribution in this city, help to understand the epidemiology of the disease
75 and to establish public health policies aimed its control.

76 Keywords: GIS, epidemiology, zoonosis.

77

78 **Introdução**

79 A leptospirose é a zoonose mais disseminada mundialmente, reconhecida em
80 todos os continentes, exceto na Antártica, e foi detectada em todas as espécies de
81 mamíferos estudados (Adler e Moctezuma, 2009). É causada por espécies
82 patogênicas da bactéria *Leptospira* spp., sendo considerada uma doença infecciosa
83 emergente, apresentando-se na forma de surto ou epidemia em diversos países,
84 sobretudo naqueles com clima tropical, como o Brasil (Levett, 2001; WHO, 2003).

85 Nos últimos anos, foram registrados surtos de leptospirose humana em
86 diversos países como no Brasil (Barcellos e Sabroza, 2000; Sarkar et al., 2002),
87 Peru (Russel et al., 2003; Céspedes et al., 2004), Japão (Narita et al., 2005),
88 Colômbia (Góngora et al., 2008) e Índia (Vijayachari et al., 2008). A leptospirose
89 pode ocorrer enquanto uma doença ocupacional, acometendo produtores rurais,
90 pescadores, médicos veterinários, limpadores de fossa, entre outros, quando estes
91 são expostos aos ambientes contaminados pela urina dos animais domésticos e
92 silvestres infectados (Russel et al, 2003; Góngora et al., 2008). Pode também afetar
93 a população urbana, sobretudo em países em desenvolvimento de clima tropical,
94 pelas deficientes condições de saneamento básico destes países (Brod et al., 2005;
95 Faria et al., 2008). Também pode ocorrer como uma doença recreacional,
96 acometendo indivíduos que praticam atividades de esporte e lazer em ambientes
97 aquáticos, contaminados pela bactéria (Narita et al., 2005; Watson et al., 2007)

98 Ainda que diversos avanços tenham ocorrido em relação ao diagnóstico de
99 leptospirose, na maioria dos países em desenvolvimento este diagnóstico não é
100 realizado de forma usual, uma vez que tanto o teste de soroaglutinação
101 microscópica (SAM) (WHO, 2003) quanto o diagnóstico molecular (Majed et al.,
102 2005; Ahmed et al., 2006; Adler e Moctezuma, 2009) são procedimentos complexos,

103 cujas técnicas são restritas aos laboratórios especializados. Além disto,
104 considerando-se que a sintomatologia clínica da leptospirose é variada e não
105 patognomônica, diversos casos não são diagnosticados. Portanto, os casos
106 notificados representam apenas uma pequena parcela do número real de casos de
107 leptospirose humana.

108 O ciclo contínuo de transmissão da doença ao homem depende da
109 combinação de condições individuais (comportamento, estilo de vida, história clínica,
110 susceptibilidade), ambientais e sócio-econômicas (Barcellos e Sabroza, 2000). O
111 homem adquire a leptospirose por meio de um reservatório animal, sendo que a
112 transmissão entre humanos é praticamente inexistente (Adler e Moctezuma, 2009).
113 Desta forma, a epidemiologia da leptospirose humana reflete as interações entre os
114 seres humanos e os hospedeiros mamíferos infectados, e o conhecimento da
115 participação dos animais como mantenedores desta enfermidade é de fundamental
116 importância (Vinetz, 2001).

117 A fonte de infecção da leptospirose em humanos usualmente associa-se ao
118 contato direto ou indireto com a urina de animais infectados, sendo os roedores
119 aqueles mais implicados com a disseminação desta doença (WHO, 2003). Depois
120 dos roedores, os cães exercem uma elevada importância na epidemiologia da
121 leptospirose humana, pelo estreito contato mantido entre estas espécies,
122 representando um elo de transmissão da enfermidade (Lefebvre, 2003).

123 Para a melhor compreensão da relação entre o espaço e o processo saúde-
124 doença, podem ser utilizados sistemas de informação geográfica (SIG) (Medronho e
125 Werneck, 2002), que consiste de um conjunto de dados ou base de dados
126 geográficos obtidos através do geoprocessamento, sensorialmente remoto ou
127 cartografia digital. Neste caso, existe o relacionamento entre dois tipos de dados:

128 espaciais e geográficos. Os dados espaciais (ou geográficos ou de localização)
129 consistem em objetos gráficos do mapa (limites políticos, territórios, entre outros). Já
130 os dados de atributos são as variáveis descritivas que caracterizam ou se
131 relacionam com a base geográfica (perfil socioeconômico, o tipo de clima, o tipo de
132 vegetação, a taxa de mortalidade, entre outros). A integração desses dados tornou
133 possível uma melhor caracterização e análise de dados espaciais, constituindo-se
134 numa ferramenta indispensável no processo de gestão dos riscos e planejamento
135 em saúde (Barcellos et al., 2008).

136 Em estudos epidemiológicos para leptospirose, a aplicação dos SIG revelou
137 grande utilidade na avaliação de fatores de risco. Em um estudo de caso-controle
138 em cães, Ghneim et al. (2007) aplicaram um SIG para avaliar a associação entre a
139 densidade hidrográfica e a localização dos casos de leptospirose, verificando
140 correlação positiva. Tassinari et al. (2008) detectaram seis agrupamentos espaciais
141 em favelas da cidade do Rio de Janeiro, verificando que a maior incidência de
142 leptospirose ocorreu no verão, devido ao elevado índice pluviométrico.

143 Objetivou-se a partir deste estudo determinar a prevalência de anticorpos anti-
144 *Leptospira* spp. em cães do município de Ilhéus, Bahia, e descrever os potenciais
145 fatores de risco associados. Além disso, realizou-se uma análise espacial para
146 investigar quais aspectos da paisagem e padrões de ocupação do espaço
147 influenciariam nesta soropositividade.

148

149 **Material e métodos**

150 *Área de estudo*

151 O estudo foi realizado no município de Ilhéus (14° 47' 20" de latitude sul e 39°
152 02' 56" de longitude oeste), localizado na região nordeste do Estado da Bahia, Brasil.
153 O município possui uma área territorial de 1.840, 991km² (IBGE, 2002). O trabalho foi
154 desenvolvido, entre os meses de agosto a dezembro de 2008, na área urbana do
155 município de Ilhéus, abrangendo bairros com população humana superior a 1000
156 habitantes.

157

158 *Amostragem e mapa de localização*

159 A população total de cães foi estimada a partir da população humana
160 pertencente à zona urbana de Ilhéus, em 133.771 habitantes (IBGE, 2002). Para o
161 cálculo de proporção cão/homem, foi utilizada a relação de 1:10, que redundou em
162 13.377 animais. O cálculo do tamanho da amostra foi realizado pelo programa
163 EpiInfo 3.3.2, considerando-se um nível de confiança de 95%, prevalência esperada
164 de 20% e erro estatístico de 5%, o que resultou em um N amostral de 241.

165 Para que essa amostra fosse distribuída proporcionalmente à população
166 humana residente em cada bairro, foram definidos 72 pontos de amostragem
167 considerando o total de bairros e a amostra de cães calculada. Para caracterizar a
168 distribuição dos pontos de amostragem, utilizou-se um mapa georreferenciado do
169 município de Ilhéus, disponível nas bases cartográficas do IBGE (2002), que foi
170 modificado, de forma a transformar os setores censitários em bairros. Foi sobreposto
171 a este mapa, imagens do satélite CBERS 2B (Satélite Sino-Brasileiro de Recursos
172 Terrestres) do sensor HRC (Câmera Pancromática de Alta Resolução), disponível

173 gratuitamente pela divisão de geração de imagens do Instituto Nacional de
174 Pesquisas Espaciais.

175 Posteriormente, os pontos de amostragem foram distribuídos aleatoriamente,
176 com o auxílio do programa ArcGIS 9.2 (Environmental Systems Research Institute,
177 Redlands, CA, USA), cujo número de pontos por bairro foi proporcional a população
178 residente (figura 1). De cada ponto de amostragem, foram colhidas amostras de
179 sangue de 4 cães distintos, em um raio de 100 m, o que resultou na ampliação do N
180 amostral de 241 para 288 animais. As coordenadas obtidas foram transferidas para
181 um Sistema de Posicionamento Global (GPS) usando o programa Trackmaker
182 (versão 13.3) e utilizados para localizar os pontos de amostragem a campo.

183

184 *Inquérito aos proprietários*

185 Os proprietários dos cães tomaram conhecimento sobre o estudo, cujo
186 consentimento de participação foi comprovado pela assinatura do termo de ciência e
187 autorização. Após a autorização, foi aplicado um questionário semi-estruturado
188 relativo aos dados epidemiológicos associados à leptospirose, sobretudo em relação
189 aos fatores de risco. Desta forma, foram investigadas questões ambientais e
190 individuais, com ênfase naquelas relativas ao manejo do animal (ANEXO1).

191 O trabalho foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais
192 da Universidade de Santa Cruz (UESC), sob o protocolo nº 022/08.

193

194 *Colheita sanguínea e a prova de SAM*

195 De cada animal, foi colhido cerca de 10 mL de sangue, mediante punção
196 venosa cefálica ou jugular, com seringa descartável de 10 mL e agulha 30 x 8 mm.
197 Este sangue foi processado no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital

198 Veterinário da UESC, onde foi centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos, para
199 obtenção do soro. O soro obtido foi acondicionado em microtubo de plástico de 1,5
200 mL e mantido em freezer a -20°C até o momento da realização da técnica de SAM.

201 A detecção de anticorpos anti-*Leptospira* spp. foi realizado pela SAM,
202 segundo as normas do Ministério da Saúde (BRASIL, 1995), empregando-se 24
203 sorovares (Australis, Bratislava, Autumnalis, Butembo, Castellonis, Bataviae,
204 Canicola, Whitcombi, Cynopteri, Djasiman, Sentot, Grippotyphosa, Hebdomadis,
205 Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Panama, Patoc, Pomona, Pyrogenes,
206 Hardjo, Wolffi, Shermani e Tarassovi), mantidos no laboratório do Serviço de
207 Diagnóstico de Zoonoses, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
208 (FMVZ), da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu, SP, em
209 meio de cultura semi-sólido de Fletcher e líquido de Ellinghausen-McCullough-
210 Jonhson-Harris (EMJH) com albumina bovina Fração V, segundo Cohn, a 30°C, e
211 mantidos por repiques semanais.

212 Os soros foram triados na diluição de 1:100, e aqueles que apresentaram
213 50% ou mais de aglutinação foram titulados em uma série de diluições geométricas
214 de razão dois. O título do soro foi a recíproca da maior diluição que apresentou
215 resultado positivo. Os antígenos foram examinados ao microscópio de campo
216 escuro, previamente aos testes, a fim de verificar a mobilidade e a presença de auto-
217 aglutinação ou de contaminantes. Caso um animal reagisse para dois ou mais
218 sorovares (coaglutinação), considerava-se como positivo o sorovar de maior título.
219 Considerou-se como ponto de corte, no presente estudo, o título de anticorpos anti-
220 *Leptospira* spp. iguais ou superiores a 1:100.

221

222 *Análise estatística e espacial dos dados*

223 O estudo dos fatores de risco, considerando o ponto de amostragem, foi
224 realizado pelo teste de qui-quadrado, adotando-se um nível de 5% de significância
225 (Kaps e Lamberson, 2004). As análises foram realizadas com o auxílio do programa
226 EpiInfo 3.3.2.

227 A análise espacial foi conduzida em duas fases, seguindo a metodologia
228 proposta por Carpenter (2001). Na primeira fase, realizou-se a visualização dos
229 resultados sorológicos no espaço para verificar a existência de padrões visíveis e na
230 segunda fase, realizou-se o teste de significância, para a avaliação da presença de
231 agrupamento espacial. A identificação de agrupamento espacial foi feita pelo método
232 proposto por Kulldorff e Nagarwalla (1995), conhecida como estatística de varredura
233 espacial. Para aplicação deste método foi realizada uma análise puramente
234 espacial, aplicando-se o modelo de distribuição de Poisson. Para se obter um valor
235 de “p” seguro foram realizadas 999 interações, sendo considerados significativos
236 valores de $p \leq 0,05$. Essa análise foi feita com o programa SaTScan (versão 8.0).

237 Para avaliar outras características da distribuição dos resultados sorológicos,
238 foram confeccionados mapas sobre o saneamento básico (IBGE, 2002) e elementos
239 da paisagem a partir de Moraes et al. (2007). Para tanto, utilizou-se o programa
240 ArcGis 9.2®, permitindo assim a sobreposição com os dados estudados. Tais dados
241 foram analisados pelo teste de qui-quadrado, adotando-se um nível de 5% de
242 significância (Kaps e Lamberson, 2004).

243

244 **Resultados**

245 Das 288 amostras colhidas, foi possível a análise de 282, havendo a perda de
246 6 amostras durante o processamento. Pela técnica de SAM, obteve-se positividade
247 para 20 amostras, representando uma prevalência de 7,1%. O intervalo de 95% de
248 confiança nos cães amostrados estabeleceu os limites de ocorrência entre 4,4% e
249 10,7%. Esses limites do intervalo de confiança estabelecem que, se outros estudos
250 forem realizados na mesma população, espera-se que 95% desses também
251 permaneçam com valores dentro desse intervalo ($7,1\% \pm 3,6\%$).

252 A distribuição dos resultados sorológicos em cada ponto foi representada por
253 círculos proporcionais correspondentes ao número de animais reagentes ao teste
254 (figura 2). Dos 72 pontos analisados, 15 apresentaram ao menos um animal
255 reagente ao teste, e em nenhum ponto foi observado 100% de positividade. Na
256 análise espacial efetuada pelo Satscan, não houve agrupamentos significativos em
257 relação aos resultados sorológicos.

258 Dos sorovares testados, o sorovar copenhageni foi o mais prevalente,
259 seguido pelos sorovares bratislava, canicola, gryppotyphosa e patoc, e os títulos de
260 anticorpos aglutinantes variaram entre 1:100 e 1:800 de acordo com a figura 3.
261 Ocorreram dois casos de reações cruzadas, uma em relação aos sorovares
262 bratislava (1:100), autumnalis (1:400) e canicola (1:100); e outra entre os sorovares
263 bratislava (1:800) e javanica (1:100). Ambos reagiram para sorogrupos
264 antigenicamente não relacionados. Nos dois casos, o sorovar de maior título foi
265 considerado o mais provável.

266 Analisando-se os fatores de risco por ponto de amostragem, foram
267 significativas pelo teste do qui-quadrado ($P \leq 0,05$) as variáveis não-vacinação;
268 período prolongado de exposição dos alimentos do cão no ambiente; hábito de caça;

269 presença de roedores; proximidade das residências com esgoto a céu aberto, e
270 proximidade das residências com terrenos baldios (tabela 1).

271 Em relação à imunização para leptospirose, 20,2% dos cães haviam sido
272 vacinados, ao menos uma vez, e dentre estes 5,2% (n=3) apresentaram
273 soropositividade no teste do SAM. Os sorovares reagentes foram grippotyphosa
274 (1:200); copenhageni (1:400); e reação cruzada entre autumnalis (1:400), bratislava
275 (1:100), canicola (1:100).

276 Em relação às análises obtidas a partir dos dados do IBGE, a figura 4 e figura
277 5 representam a distribuição do percentual da rede de esgoto e de fossa séptica,
278 respectivamente, por bairro no município de Ilhéus. De acordo com a localização dos
279 pontos, pode-se verificar que não foi observada diferença significativa na frequência
280 de positividade em relação à rede de esgoto (tabela 2) e nem em relação à fossa
281 séptica (tabela 3).

282 A relação entre os pontos amostrados e a cobertura vegetal pode ser
283 visualizada na figura 6. De acordo com as características do ambiente, foi observado
284 que nas áreas de mangues e mata obteve-se a maior frequência de positividade.
285 Entretanto, não houve diferença significativa entre estes e os locais onde a cobertura
286 vegetal estava ausente (tabela 4).

287

288 **Discussão**

289 A leptospirose é um problema de saúde pública mundial, que possui maior
290 prevalência em áreas tropicais úmidas e subtropicais, onde se encontra a maioria
291 dos países em desenvolvimento. Esta maior prevalência é atribuída às condições
292 climáticas e ambientais destas regiões, que favorecem a manutenção da *Leptospira*
293 spp. nestes habitats, em decorrência da alta temperatura, umidade, presença de
294 animais domésticos e silvestres infectados, e baixa condição de saneamento básico
295 (Faine, 1999; WHO, 2003; Dias et al., 2007; Reis et al., 2008).

296 O local escolhido para este estudo apresenta um clima tropical (20° a 24°) e
297 pluviosidade anual de 1500-2000 mm. Além disto, a região sul da Bahia conserva a
298 parcela mais significativa da Mata Atlântica no Nordeste do Brasil, apresentando uma
299 grande riqueza de espécies da fauna e flora, sendo considerada como um dos
300 principais centros de endemismo da Mata Atlântica (Campanili e Prochrow, 2006).
301 Em relação aos animais domésticos, estima-se que a população canina seja superior
302 a 13.000 animais na área urbana. Estes, muitas vezes, são mantidos de forma
303 peridomiciliar. Quanto às questões sanitárias do município, estima-se que menos de
304 50% da população tenha acesso à rede de esgoto (IBGE, 2002).

305 Apesar de possuir diversos fatores de risco associados com a leptospirose, a
306 soroprevalência da *Leptospira* spp. na população de cães deste estudo foi de 7,1%,
307 índice considerado baixo, em comparação aos estudos semelhantes realizados em
308 outras regiões do Brasil (15-23%) (Mascolli et al., 2002; Batista et al., 2005; Silva et
309 al., 2006; Aguiar et al., 2007) e em outros países (14-36%) (O'Keefe et al., 2002;
310 Stokes et al., 2007; Millán et al., 2008).

311 Neste estudo, diversos fatores de risco foram avaliados quanto à associação
312 com a soroprevalência sendo significativa a variável não-vacinação. No Brasil, para

313 a imunização de cães são disponíveis comercialmente vacinas múltiplas contendo
314 bacterinas dos sorovares icterohaemorrhagiae e canicola. Também há a
315 disponibilidade de vacinas contendo as bacterinas dos sorovares pomona e
316 grippotyphosa, em associação as duas já citadas. Estudos demonstraram que as
317 bacterinas presentes em vacinas são eficientes para a imunização de cães,
318 entretanto, estas são para sorovares específicos, não havendo imunização cruzada
319 com outros sorovares (André-Fontaine, 2006; Greene et al., 2006; Srivastava, 2006;
320 Minke et al., 2009). No presente estudo, observou-se que apenas 20% dos animais
321 haviam sido imunizados contra a leptospirose, em algum momento de sua vida.
322 Dentre os vacinados, 5,7% foram soropositivos, sendo que nenhum destes foi
323 reagente para o sorovar icterohaemorrhagiae, e em um destes houve reação
324 cruzada para o sorovar canicola (1:100). Este resultado reforça a importância da
325 imunização como medida preventiva para o controle da leptospirose, e a
326 necessidade da conscientização dos proprietários dos cães em relação a esta
327 prática.

328 O manejo adequado da alimentação dos cães também deve ser considerado
329 como medida para o controle da leptospirose, uma vez que alimentos ou água
330 deixados expostos por tempo prolongado no ambiente podem constituir-se como
331 meio de transmissão, desde que contaminados com a urina de animais infectados,
332 sendo os roedores mais implicados neste caso (WHO, 2003). Neste estudo,
333 observou-se que ambos, período prolongado de exposição dos alimentos do cão no
334 ambiente e presença de roedores, foram considerados como fatores de risco
335 associados à soroprevalência.

336 Também foram considerados como fatores de risco, a proximidade das
337 residências com esgoto a céu aberto e proximidade das residências com terrenos

338 baldios. Esses dados também poderiam ser corroborados pelo SIG, no entanto,
339 ferramentas de geoprocessamento não foram utilizadas neste caso. Tal associação
340 significativa possivelmente decorre do fato de que nestas áreas há o acúmulo de
341 dejetos, resíduos e lixo, o que atrai animais errantes e roedores, que quando
342 infectados pela *Leptospira* spp., contribuem para a disseminação do agente aos
343 indivíduos ali residentes (FUNASA, 2002). No Brasil, surtos da leptospirose foram
344 registrados em bairros com baixa infra-estrutura sanitária (Maciel et al., 2008; Reis et
345 al., 2008), havendo também relatos da associação entre a presença de aglutininas
346 anti-*Leptospira* spp. em cães e estas condições (Brandespim et al., 2006).

347 Desde 1917, sabe-se que os roedores são os mais implicados na
348 disseminação da leptospirose ao homem (Ido et al., 1917), constituindo-se como
349 hospedeiros de manutenção, sobretudo em relação aos sorovares
350 icterohaemorrhagiae e copenhageni, pertencentes ao mesmo sorogrupo (Levett,
351 2001). Nesse estudo, o sorovar copenhageni foi o mais prevalente, e este possui
352 como principal hospedeiro de manutenção a ratazana de esgoto (*Rattus norvegicus*)
353 (Faria et al., 2008), fato que provavelmente também ocorre no município de Ilhéus.

354 A não prevalência do sorovar icterohaemorrhagiae neste estudo pode refletir
355 uma característica particular da epidemiologia da leptospirose nesta região, uma vez
356 que existem variações entre os hospedeiros de manutenção em relação à
357 localização geográfica (Levett, 2001). O que justifica a necessidade de trabalhos
358 epidemiológicos em regiões distintas para que haja uma melhor compreensão desta
359 enfermidade.

360 Neste estudo, o hábito de caça dos cães foi apontado como fator de risco
361 para a soroprevalência da *Leptospira* spp. Animais silvestres como gambá (*Didelphis*
362 *marsupialis*), guaxinim (*Procyon cancrivorous*) e esquilos (*Sciurus vulgaris*) têm sido

363 apontados como possíveis hospedeiros de manutenção dos sorovares autumnalis,
364 gryppotyphosa, cynopteri, javanica e djasiman (Ward, 2002; Greene et al., 2006).
365 Estes sorovares também foram encontrados nesse estudo e sua ocorrência pode
366 estar associada à frequência de positividade observada em áreas de mata ou de
367 manguezais. Sendo assim, uma maior proximidade do homem com o ambiente
368 silvestre, poderia justificar a ocorrência destes sorovares nos animais domiciliados
369 da zona urbana.

370 Em termos de epidemiologia e saúde pública, a identificação do sorovar
371 baseado em testes sorológicos continua a exercer elevada importância para
372 diagnóstico de leptospirose. Embora as técnicas de diagnóstico molecular sejam
373 mais específicas (Majed et al., 2005; Ahmed et al., 2006; Adler e Moctezuma, 2009),
374 somente por meio dos testes sorológicos é possível o conhecimento dos sorovares
375 presentes numa determinada região (Levett, 2007). Com isso, podem-se obter
376 informações sobre as prováveis fontes de infecção desta enfermidade entre os
377 animais, como também auxiliar na elaboração de vacinas mais direcionadas e
378 eficazes para o controle da doença.

379 A despeito da baixa prevalência encontrada nesse estudo, é importante
380 ressaltar que diversos fatores de risco associados à leptospirose estão presentes no
381 local estudado. Em um estudo de caso-controle em cães, Ghneim et al. (2007)
382 demonstraram que a exposição dos cães a animais silvestres e a áreas com maior
383 índice pluviométrico foram fatores de risco importantes para a doença. Em um bairro
384 carente do município de Botucatu, Faccioli et al. (2007) mostraram que a deficiência
385 na infra-estrutura sanitária do bairro influenciou na alta soropositividade dos cães
386 (72%). Tal fato aponta para a possibilidade de que outros fatores de risco, ainda não

387 estudados, e associados com os hospedeiros de manutenção, participem da
388 epidemiologia desta doença.

389 Embora esse estudo não tenha identificado agrupamentos espaciais
390 significativos entre os pontos amostrados, as relações dos resultados sorológicos
391 com o ambiente podem ser notadas pela da visualização e interpretação dos mapas
392 produzidos. A leptospirose, como outras doenças de forte influência de condições
393 ambientais, possui múltiplos níveis de determinação. O estudo da sua distribuição
394 espacial permite à associação com fatores climáticos e ecológicos, e uma melhor
395 compreensão sobre a epidemiologia desta zoonose (Barcellos et al., 2003).

396

397 **Conclusões**

398 Mesmo que em baixos índices, a soroprevalência para *Leptospira* spp. em
399 cães hígidos no município de Ilhéus indica a presença deste agente no meio, e a
400 possibilidade de disseminação para população humana ali residente. O
401 conhecimento dos sorovares envolvidos, bem como de sua distribuição espacial,
402 auxiliam na compreensão da epidemiologia desta enfermidade e no estabelecimento
403 de políticas de saúde pública, que visem seu o controle.

404

405 **Referências**

406 Adesiyun, A.A., Hull-Jackson, C., Mootoo, N., Halsall, S., Bennett, R., Clarke, N.R.,
407 Whittington, C.U.; Seepersadsingh, N., 2006. Sero-epidemiology of canine
408 leptospirosis in Trinidad: serovars, implications for vaccination and public health. J.
409 Vet. Med. B 53, 91-99.
410 Adler, B., Moctezuma, A.P., 2009. Leptospira and leptospirosis. Vet Microbiol. Doi:
411 10.1016/j.vetmic.2009.

- 412 Aguiar, D.M., Cavalcante, G.T., Lara, M.C.C.S.H., Villalobos, E.M.C., Cunha, E.M.S.,
413 Okuda, L.H., Stefano, E., Nassar, A.F.C., Souza, G.O., Vasconcellos, S.A., Labruna,
414 M.B., Camargo, L.M., Gennari, S.M., 2008. Prevalência de anticorpos contra agentes
415 virais e bacterianos em eqüídeos do município de Monte Negro, Rondônia,
416 Amazônia Ocidental Brasileira. Braz. J.Vet. Res. Anim. Sci. 45, 296-276.
- 417 Aguiar, D.M., Cavalcante, G.T., Marvulo, M.F.V., Silva, J.C.R., Pinter, A.,
418 Vasconcellos, S.A., Moraes, Z.M., Labruna, M.B., Camargo, L.M.A, Gennari, S.M.,
419 2007. Fatores de risco associados à ocorrência de anticorpos anti-*Leptospira* spp.
420 em cães do município de Monte Negro, Rondônia, Amazônia Ocidental Brasileira.
421 Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 59, 70-76.
- 422 Aguiar, D.M., Gennari, S.M., Cavalcante, G.T., Labruna, M.B., Vasconcellos, S.A.,
423 Rodrigues, A.A.R., Moraes, Z.M., Camargo, L.M.A., 2006. Seroprevalence of
424 *Leptospira* spp in cattle from Monte Negro municipality, Western Amazon, Brazil.
425 Pesq. Vet. Bras. 26, 102-104.
- 426 Ahmed, N., Devi, S.M., Valverde, M.A., Vijayachari, P. Machang'u, R.S., Ellis, W.A.,
427 Hartskeerl, R.A. 2006. Multilocus sequence typing method for identification and
428 genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. Ann Clin Microbiol
429 Antimicrob. Doi:10.1186/1476-0711-5-28.
- 430 André-Fontaine, G. 2006. Canine leptospirosis—Do we have a problem? Vet
431 Microbiol. 117, 19-24.
- 432 Araújo, V.E.M., Moreira, E.C., Naveda, L.A.B., Silva, J.A., Contrenas, R.L., 2005.
433 Frequência de aglutininas anti-*Leptospira interrogans* em soros sanguíneos de
434 bovinos, em Minas Gerais, de 1980 a 2002. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 57, 430-
435 435.

- 436 Aslantas, O., Ozdemir, V., Kiliç, S., Babur, C., 2005. Seroepidemiology of
437 leptospirosis, toxoplasmosis and leishmaniosis among dogs in Ankara, Turkey. *Vet*
438 *Parasitol.* 129, 187-191.
- 439 Barcellos, C. R., Ramalho, W.M., Gracie, R., Magalhães, M.A.F.M., Fontes, M.P.,
440 Skaba, D., 2008. Georreferenciamento de dados de saúde na escala submunicipal:
441 algumas experiências no Brasil. *Epidemiol. Serv. Saude* 17, 59-70.
- 442 Barcellos, C., Lammerhirt, C.B., Almeida, M.A.B., Santos, E., 2003. Distribuição
443 espacial da leptospirose no Rio Grande do Sul, Brasil: recuperando a ecologia dos
444 estudos ecológicos. *Cad Saude Publica* 19, 1283-1292.
- 445 Barcellos, C., Sabroza, P.C., 2000. Socio-environmental determinants of the
446 leptospirosis outbreak of 1996 in western Rio de Janeiro: a geographical approach.
447 *Int J Environ Health Res* 10, 301–313.
- 448 Batista, C.S.A., Alves, C.J., Azevedo, S.S., Vasconcellos, S.A., Morais, Z.M.,
449 Clementino, I.J., Alves, F.A.L.; Lima, F.S., Araújo Neto, J.O., 2005. Soroprevalência
450 e fatores de risco para a leptospirose em cães de Campina Grande, Paraíba. *Arq.*
451 *Bras. Med. Vet. Zootec.* 57, 179-185.
- 452 Brandespim, D.F., Gírio, R.J.S., Ferraudo, A.S., Amaral Neto, J., Magajevsky, F.S.,
453 2005. Utilização do sistema de informação georreferenciada (SIG) no estudo da
454 ocorrência da *Leptospira interrogans*, sorovares canicola e icterohaemorrhagiae, na
455 população canina do Município de Jaboticabal, Estado de São Paulo. *Ars Veterinaria*
456 21, 51-61.
- 457 Brasil (2 ed), 1995. Manual de leptospirose. Fundação Nacional de Saúde, Brasília.
- 458 Brod, C.S., Aleixo, J.A.G., Jouglard, S.D.D., Fernandes, C.P.H., Texeira, J.L.R.,
459 Dellagostin, O.A., 2005. Evidência do cão como reservatório da leptospirose

- 460 humana: isolamento de um sorovar, caracterização molecular e utilização em
461 inquérito sorológico. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 38, 294-300.
- 462 Campanili, M., Prochow, M., (1 ed) 2006. Mata Atlântica – uma rede pela floresta.
463 RMA, Brasília. ISBN: 85-99824-01-5.
- 464 Carpenter, T.E., 2001. Methods to investigate spatial and temporal clustering in
465 veterinary epidemiology. Prev Vet Med 48, 303-320.
- 466 Céspedes, M.Z., Fernández, R.C., Rimarachin, R.D., Taípe, H.S., Cenepo, J.T.,
467 Gonzales, M.M., Torres, I.T., Castillo, C.C., Balda, L.J., Tapia, R.L., Gonzales, D.Q.,
468 Glennny, M.A., 2004. Leptospirosis: una enfermedad zoonótica hiperendémica en la
469 provincia de Coronel Portillo. Ucayali, Perú. Rev Peru Med Exp Salud Publica 21, 62-
470 70.
- 471 Chiareli, D., Moreira, E.C., Gutiérrez, H.O.D., Rodrigues, R.O., Marcelinho, A.P.;
472 Meneses, J.N.C., Almeida, V.M.A., 2008. Frequência de aglutininas anti-leptospira
473 interrogans em eqüídeos em Minas Gerais, 2003 a 2004. Arq. Bras. Med. Vet.
474 Zootec. 60, 1576-1579.
- 475 Dias, J.P., Texeira, M.G., Costa, M.C.N., Mendes, C.M.C., Guimarães, P., Reis,
476 M.G., Ko, A.; Barreto, M.L., 2007. Factors associated with *Leptospira* sp infection in a
477 large urban center in Northeastern Brazil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 40, 499-504.
- 478 Faccioli, P.Y., Camossi, L.G., Langoni, H., Menozzi, B.D., Daher, S.R., 2007. Fatores
479 de risco para leptospirose canina em bairro carente, jardim Santa Elisa, Botucatu,
480 São Paulo, Brasil. Vet. e Zootec. 14, 306-314.
- 481 Faine, S. (2 Ed), 1999. *Leptospira* and Leptospirosis. MediSci, Melbourne.
- 482 Faria, M.T., Calderwood, M.S., Athanazio, D.A., McBride, A.J.A., Hartskeerl, R.A.,
483 Pereira, M.M., Ko, A.I., Reis, M.G., 2008. Carriage of *Leptospira interrogans*

484 domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. Acta
485 Tropica 108, 1-5.

486 Funasa (1 ed), 2002. Manual de controle de roedores. Fundação Nacional de Saúde,
487 Brasília.

488 Ghneim, G.S., Viers, J.H., Chomel, B.B.; Kass, P.H.; Descollonges, D.A.; Johnson,
489 M.L., 2007. Use of a case-control study and geographic information systems to
490 determine environmental and demographic risk factors for canine leptospirosis. Vet.
491 Res. 38, 37-50.

492 Girio, R.J.S., Pereira, F.L.G.; Marchiori Filho, M., Mathia, L.A.; Herrera, R.C.P;
493 Alessi, A.C.; Girio, T.M.S., 2004. Pesquisa de anticorpos contra *Leptospira* spp. em
494 animais silvestres e em estado feral da região de Nhecolandia, Mato Grosso do Sul,
495 Brasil. Utilização da técnica de imuno-histoquímica para detecção do agente. Cienc
496 Rural 34, 165-169.

497 Góngora, A., Parra, J.; Aponte, L.H.; Gómez, L.A., 2008. Seroprevalencia de
498 *Leptospira* spp. en Grupos de Población de Villavicencio, Colômbia. Rev Salud
499 Publica 10, 269-278.

500 Greene, C.E., Sykes, J.E., Brown, C.A., Hartmann, K., 2006. Leptospirosis. In:
501 Greene,C.E. (3 Ed), Infectious disease of the dog and cat. Saunders, Missouri,
502 pp.402-417.

503 IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2002. Base de informações por
504 setor censitário. CD-ROM. Rio de Janeiro: IBGE.

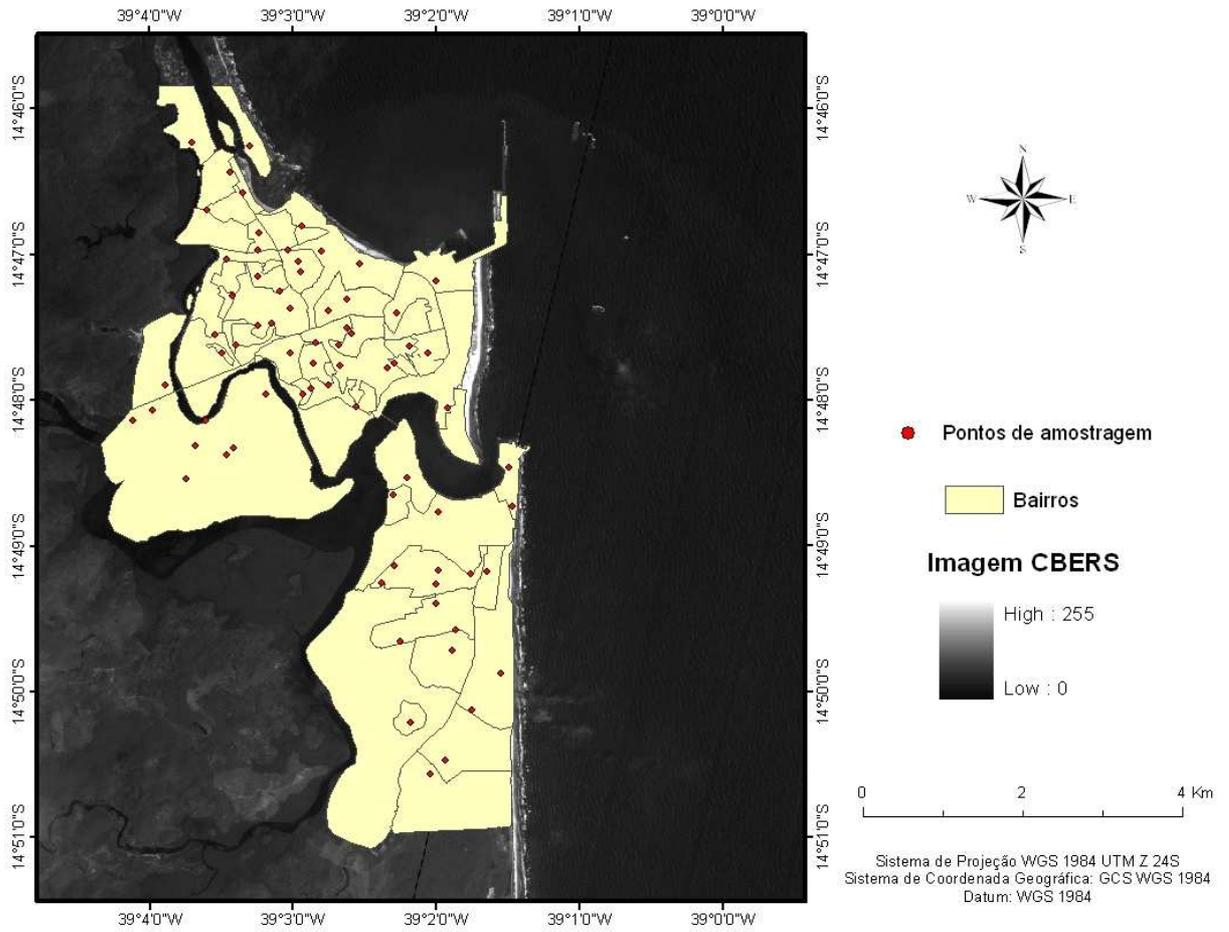
505 Ido, Y., Hoki, R., Ito, H., Wani, H., 1917. The rat as a carrier of spirochaeta
506 icterohaemorrhagiae, The causative agent of Weil's disease (*Spirochaetosis*
507 *icterohaemorrhagica*). J. Exp. Med. 26, 341 - 353.

- 508 Jung, B.Y., Choi, J.S., Kim, K.T., Song, Y.K, Lee, S.H., Lee, K.W., KIM, J.Y., Moon,
509 O.K., 2007. Seroprevalence of Leptospirosis in Korean Municipal Zoo Animals. J.
510 Vet. Med.Sci. 69, 861-863.
- 511 Kaps, M.; Lamberson, W.R., 2004. Biostatistics for animal science. ISBN
512 08511998208.
- 513 Kulldorff, M., Nagarwalla, N., 1995. Spatial disease clusters: Detection and inference.
514 Stat Med 14, 799–810.
- 515 Lefebvre, R.B., 2003. Leptospiras. In: Hirsh, D.C.; Zee, Y.C., Microbiologia
516 Veterinária. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp.174-178.
- 517 Levett, P.N., 2001. Leptospirosis. Clin Microbiol Rev 14, 296–326.
- 518 Levett, P.N. 2007. Sequence-based typing of *Leptospira*: epidemiology in the
519 genomic era. Plos Negl Trop Dis 1, 1-2.
- 520 Lopes, A.L.S., Silva, W.B., Padovani, C.R., Langoni, H., Modolo, J.R., 2005.
521 Frequência sorológica antileptospírica em cães: sua correlação com roedores e
522 fatores ambientais, em área territorial urbana. Arq. Inst. Biol. 72, 289-296.
- 523 Maciel, E.A.P., Carvalho, A.L.F., Nascimento, S.F., Matos, R.B., Gouveia, E.L., Reis,
524 M.G., Ko, A.I., 2008. Household transmission of *Leptospira* infection in urban slum
525 communities. Plos Negl Trop Dis. Doi:10.1371/journal.pntd.0000154.
- 526 Majed, Z., Bellenger, E., Postic, D., Pourcel, C., Baranton, G., Picardeau, M. 2005.
527 Identification of Variable-Number Tandem-Repeat Loci in *Leptospira interrogans*
528 Ssensu Stricto. J Clin Microbiol 43, 539–545.
- 529 Masculli, R., Pinheiro, S.R., Vasconcellos, S.A, Ferreira, F., Morais, Z.M., Pinto,
530 C.O., Sucupira, M.C.A., Dias, R.A., Miraglia, F., Cortez, A., Silveira da Costa, Tabata,
531 S.R., Marcondes, A.G., 2002. Inquérito sorológico para leptospirose em cães do

- 532 município de Santana de Parnaíba, São Paulo, utilizando a campanha de vacinação
533 anti-rábica do ano de 1999. Arq. Inst. Biol. 69, 25-32.
- 534 Medronho, R.A.; Werneck, G.L., 2002. Técnicas de análise espacial em saúde. In:
535 Medronho, R.A. (org.), Epidemiologia. Ateneu, São Paulo, pp.427-436.
- 536 Millán, J., Candela, M.G., López-Bao, J.V., Pereira, M., Jiménez, M.A., León-
537 Vizcaíno, L., 2008. Leptospirosis in Wild and Domestic Carnivores in Natural Areas in
538 Andalusia, Spain. Vector Borne Zoonotic Dis. Doi:10.1089/vbz.2008.0081. 2008.
- 539 Mineiro, A.L.B.B., Bezerra, E.E.A., Vasconcellos, S.A., Costa, F.A.L., Macedo, N.A.,
540 2007. Infecção por *Leptospira* em bovinos e sua associação com transtornos
541 reprodutivos e condições climáticas. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 59, 1103-1109.
- 542 Minke, J.M., Bey, R., Tronel, J.P., Latour, S., Colombet, G., Yvarel, J., Cariou, C.,
543 Guiot, A.L., Cozette, V., Guigal, P.M., 2009. Onset and duration of protective
544 immunity against clinical disease and renal carriage in dogs provided by a bi-valent
545 inactivated leptospirosis vaccine. Vet Microbiol 137, 137-145.
- 546 Moraes, M. E. B. , Schiavetti, A., Strenzel, G. M. R. , Silva, G. S., 2007. Avaliação
547 das áreas verdes da mancha urbana contínua de Ilhéus (Bahia). In: VIII Congresso
548 de Ecologia do Brasil, 2007, Caxambu. Anais do VIII Congresso de Ecologia do
549 Brasil: Ecologia no Tempo de Mudanças Globais. Rio Claro: Sociedade de Ecologia
550 do Brasil.
- 551 Narita, M., Fujitani, S., Haake, D.A., Paterson, D.L., 2005. Leptospirosis after
552 recreational exposure to water in the Yaeyama Islands, Japan. Am J Trop Med Hyg
553 73, 652-656.
- 554 O'Keefe, J.S., Jenner, J.A., Sandifer, N.C., Antony, A., Williamson, N.B., 2002. A
555 serosurvey for antibodies to *Leptospira* in dogs in the lower North Island of New
556 Zealand. N Z Vet J 50, 23-25.

- 557 Levett, P.N., 2007. Sequence-based typing of *Leptospira*: epidemiology in the
558 genomic era. Plos Neglected tropical diseases. Doi: 10.1371/journal.pntd.0000120.
- 559 Reis, R.B., Ribeiro, G.S, Felzemburgh, R.D.M., Santana, F.S., Mohr, S., Melendez,
560 A.X.T.O, Queiroz, A., Santos, A.C., Ravines, R.R., Tassinari, W.S., Carvalho, M.S.
561 Reis, M.G., Ko, A.I., 2008. Impact of environmental and social gradient on *Leptospira*
562 infection in urban slums. PLoS Negl Trop Dis. Doi:10.1371/journal.pntd.0000228.
- 563 Russel, K.L., Gonzalez, M.A.M., Watts, D.M., Lagos-Figueira, R.C., Chauca, G., Ore,
564 M., Gonzalez, J.E., Morono, C., Tesh, R.B., Vinetz, J.M., 2003. An outbreak of
565 leptospirosis among peruvian military recruits. Am J Trop Med Hyg 69, 53-57.
- 566 Sarkar, U., Nascimento, S.F., Barbosa, R., Martins, R., Nuevo, H., Kalafanos, I.,
567 Grunstein, I., Flannery, B., Dias, J., Riley, L.W., Galvão Reis, M., Ko, I.A., 2002. A
568 population-based case-control investigation of risk factors for leptospirosis during an
569 urban epidemic. Am J Trop Med Hyg 66, 605-610.
- 570 Silva, W.B., Simões, L.B., Lopes, A.L.S., Padovani, C.R., Langoni, H., Modolo, J.R.,
571 2006. Avaliação de fatores de risco de cães sororreagentes à *Leptospira* spp. e sua
572 distribuição espacial, em área territorial urbana. Braz. J. vet. Res. anim. Sci. 43, 783-
573 792.
- 574 Srivastava, S.K., 2006. Prospects of developing leptospiral vaccines for animals.
575 Indian J Med Microbiol 24, 331-336.
- 576 Stokes, J.E., Kaneene, J.B., Schall, W.D., Kruger, J.M., Miller, R.A., Kaiser, L., Bolin,
577 C.A., 2007. Prevalence of serum antibodies against six *Leptospira* serovars in
578 healthy dogs. J Am Vet Med Assoc 230, 1657-1664.
579 Doi: 10.2460/javma.230.11.1657.

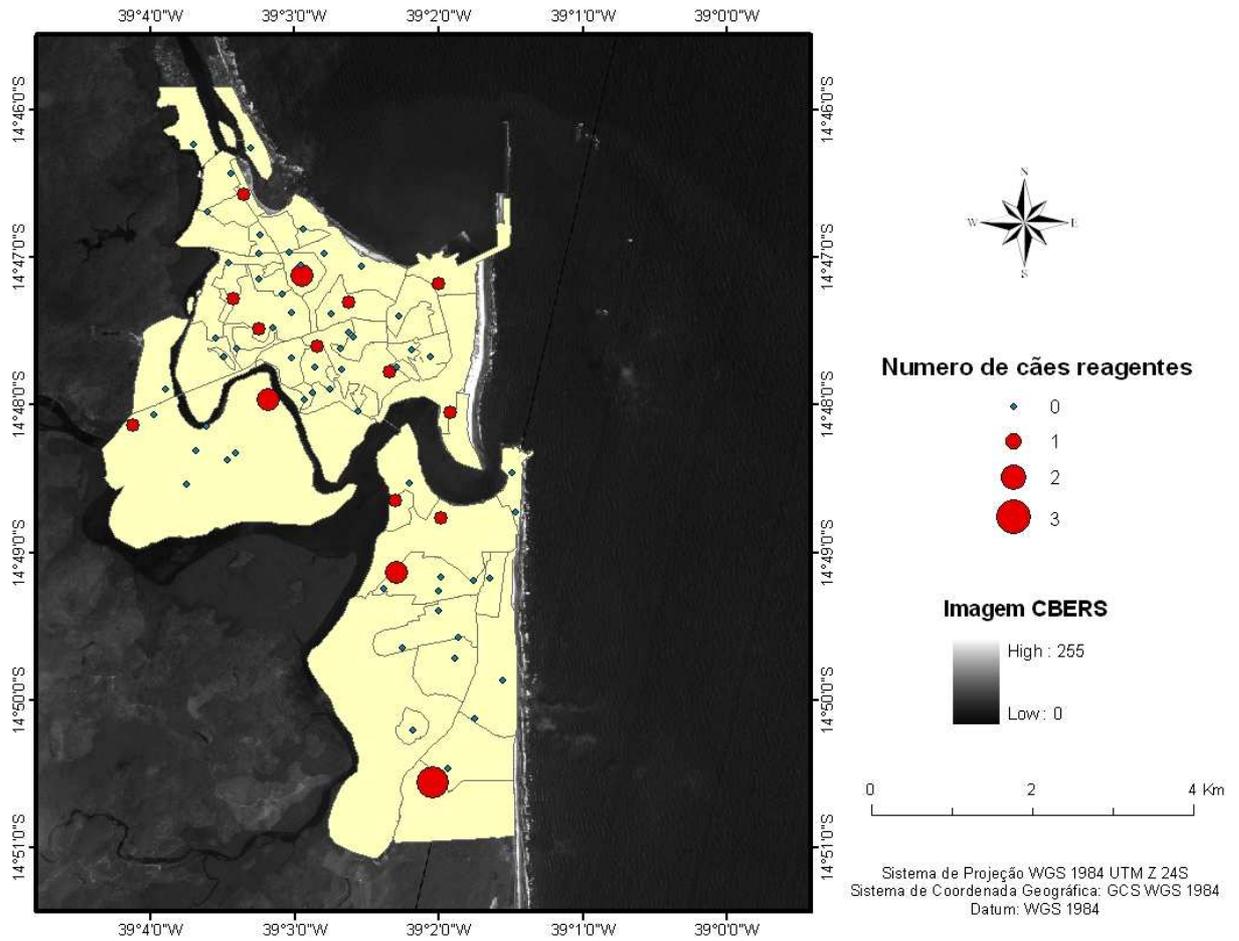
- 580 Tassinari, W.S., Pellegrini, D.C.P., Sá, C.B.P., Reis, R.B., Ko, A.I., Carvalho, M.S.,
581 2008. Detection and modelling of case clusters for urban leptospirosis. *Trop Med Int*
582 *Health* 13, 503-512.
- 583 Vijayachari, P., Sugunan, A.P., Shriram, A.N., 2008. Leptospirosis: an emerging
584 global public health problem. *J. Biosci.* 33, 557–569.
- 585 Vinetz, J.M., 2001. Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis* 14, 527-538.
- 586 Ward, M.P., 2002. Seasonality of canine leptospirosis in the United States and
587 Canada and its association with rainfall. *Prev Vet Med* 56, 203-213.
- 588 Watson, J.T., Michelle, G., Connolly, M.A., 2007. Epidemics after natural disasters.
589 *Emerg Infect Dis* 13, 1-5.
- 590 WORLD HEALTH ORGANIZATION. Human leptospirosis: Guidance for diagnosis,
591 surveillance and control. 2003. Disponível em:
592 http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.23.pdf. Acesso em:
593 20 set. 2007.



594

595 Fig. 1. Mapa georreferenciado modificado do município de Ilhéus com a distribuição
596 aleatória dos 72 pontos de amostragem.

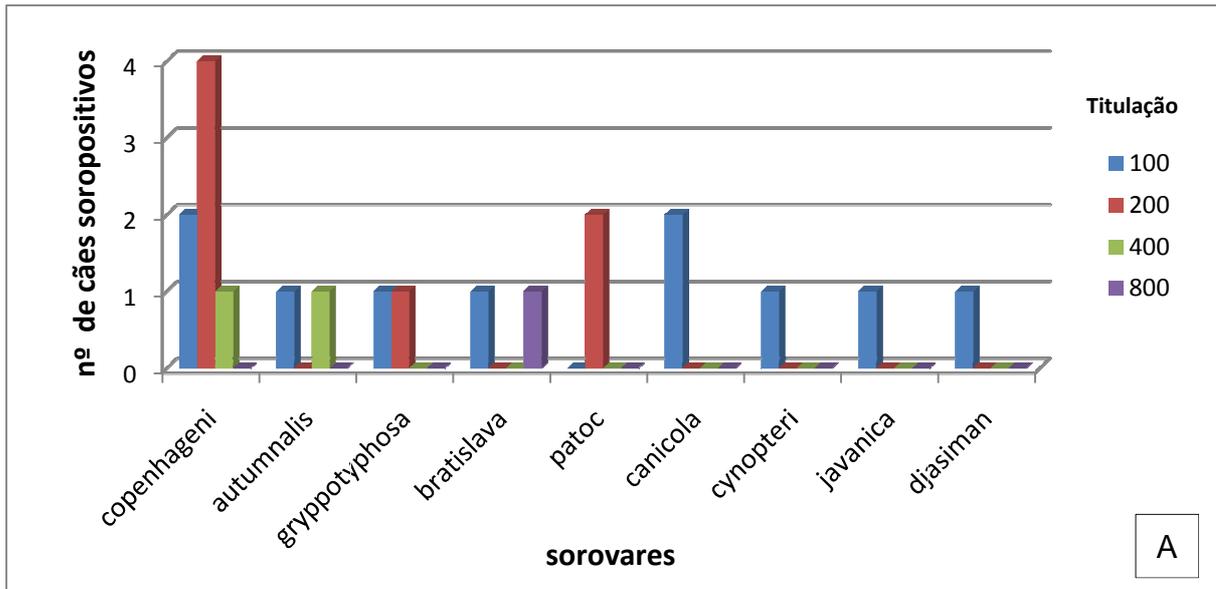
597



598

599 Fig. 2. Distribuição dos resultados sorológicos para a presença de anticorpos anti-
600 leptospira em cães, de acordo com o número de animais reagentes por ponto de
601 amostragem.

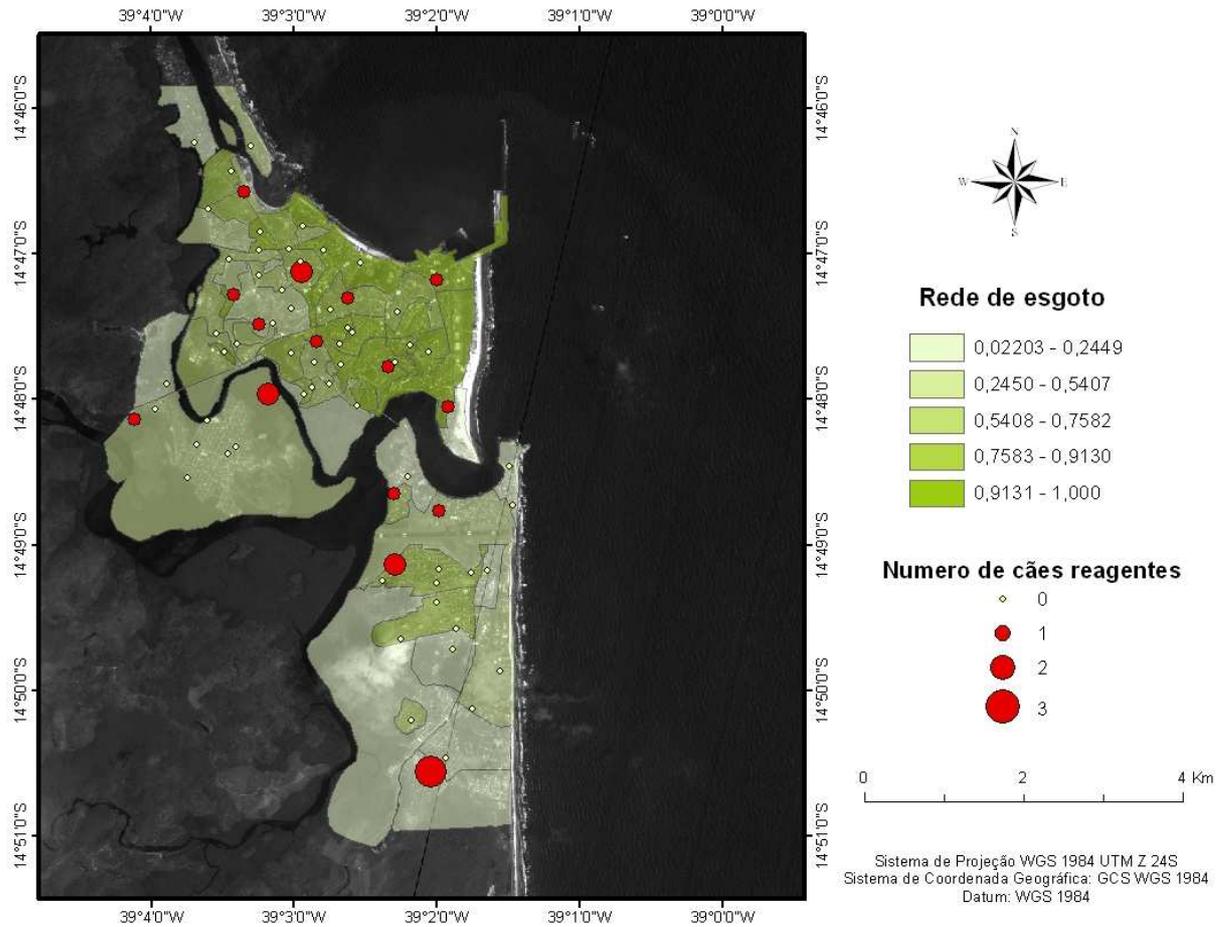
602



603

604 Fig. 3. Distribuição de títulos de anticorpos anti-*Leptospira* em cães, considerando o
 605 sorovar de maior título, na área territorial urbana de Ilhéus, Bahia, Brasil.

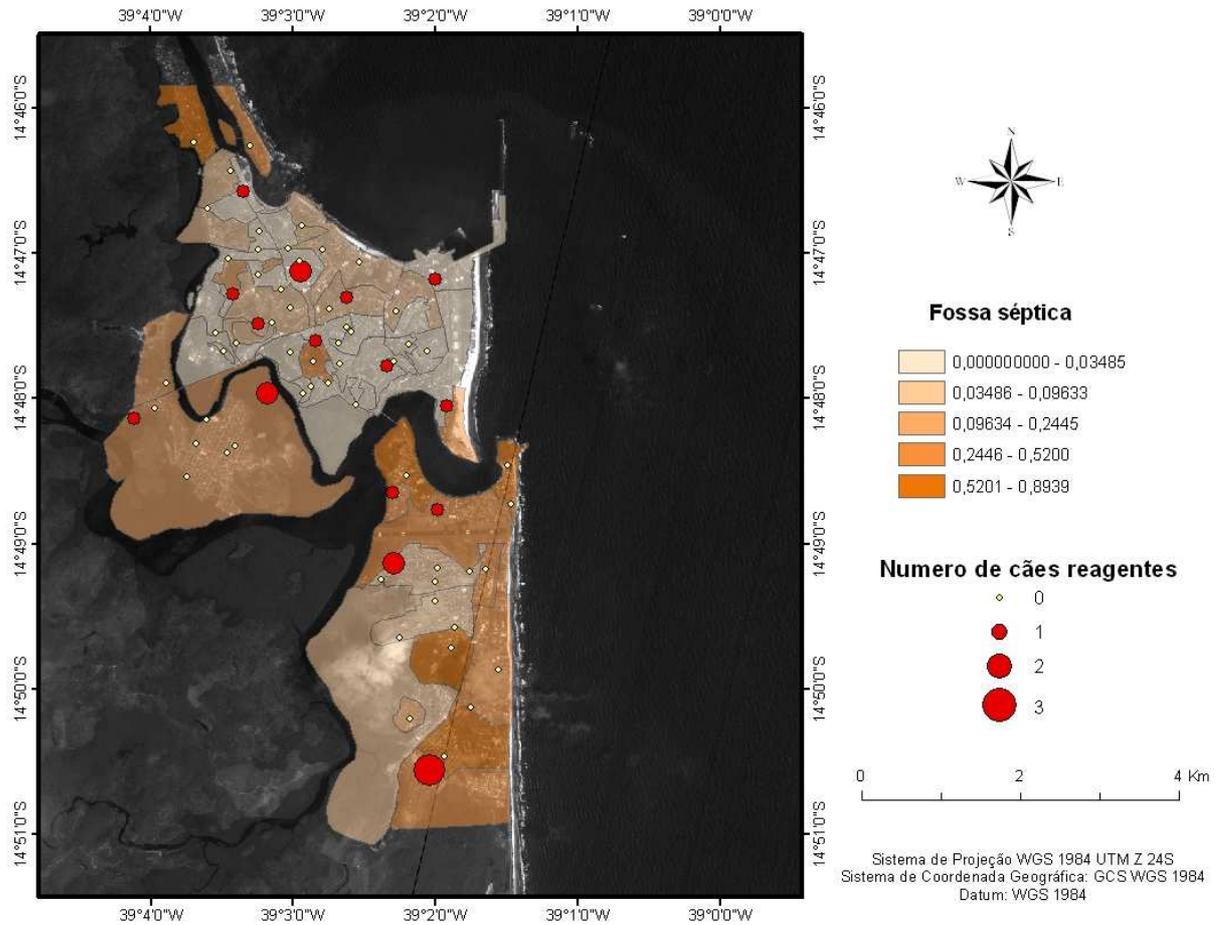
606



607

608 Fig. 4. Distribuição dos resultados sorológicos de anticorpos anti-leptospira em cães,
609 em relação ao percentual de rede de esgoto, da área urbana do município de Ilhéus,
610 BA.

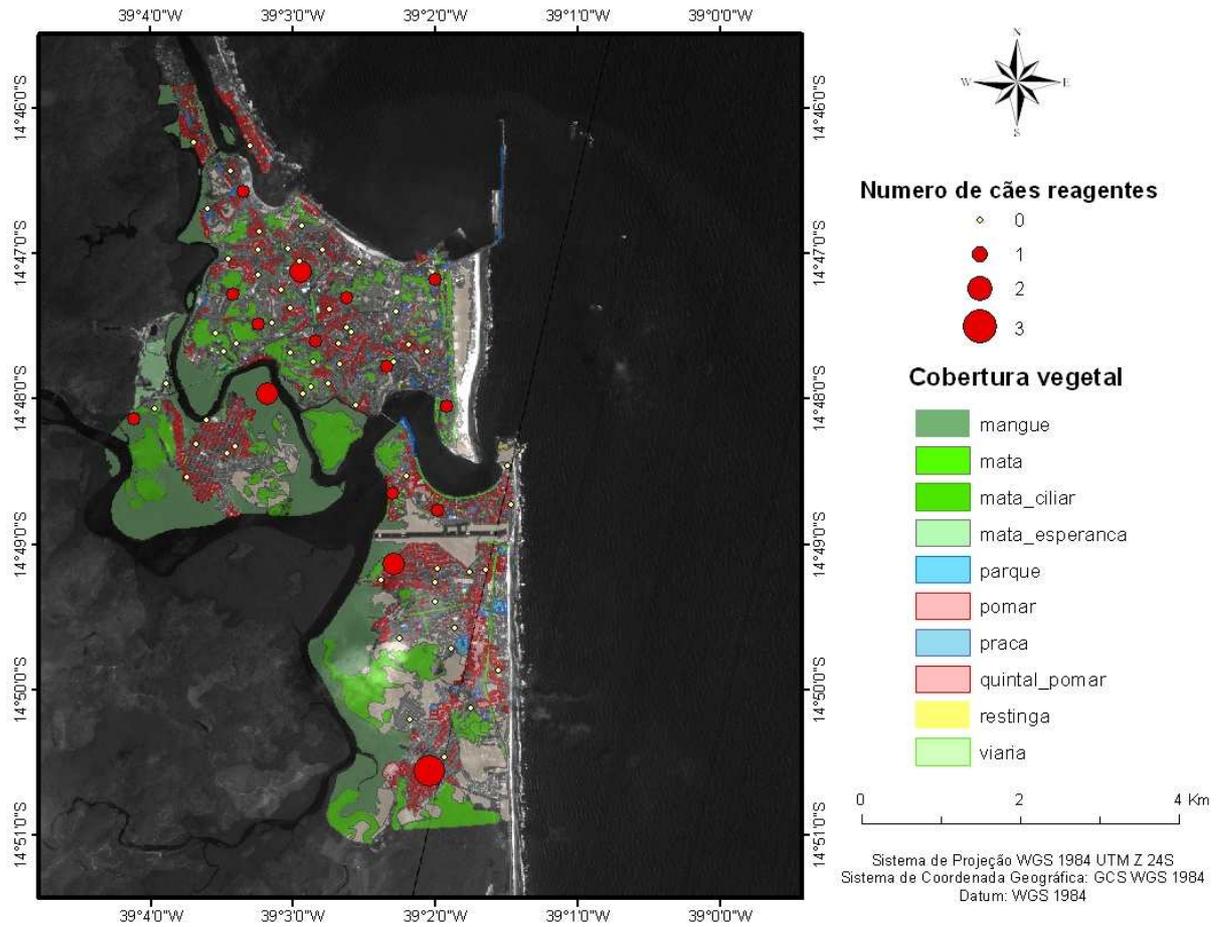
611



612

613 Fig. 5. Distribuição dos resultados sorológicos de anticorpos anti-leptospira em cães,
614 em relação ao percentual de fossa séptica, da área urbana do município de Ilhéus,
615 BA.

616



617

618 Fig. 6. Distribuição dos resultados sorológicos de anticorpos anti-leptospira em cães,
 619 em relação ao tipo de cobertura vegetal, da área urbana do município de Ilhéus, BA.

620

621 Tabela 1

622 Distribuição do número de cães e soropositividade em relação ao ponto de
 623 amostragem, segundo as variáveis estudadas

624

Variável	Análise univariada por ponto de amostragem		
	χ^2	nº pontos observados	<i>P</i>
Vacinação			
Sim	34,94	36	0,51
Não	107,23	70	0,003**
Acesso de rua			
Sim	81,61	69	0,14
Não	97,05	62	0,003**
Alimento exposto por tempo prolongado			
Sim	97,05	62	0,002**
Não	72,03	62	0,17
Hábito de caça			
Sim	79,75	61	0,05**
Não	82,21	70	0,15
Contato com outros animais			
Sim	76,24	71	0,31
Não	65,82	57	0,19
Presença de roedores			
Sim	91,27	69	0,03**
Não	49,33	36	0,06
Proximidade com esgoto a céu aberto			
Sim	39,84	27	0,05**
Não	75,70	67	0,21
Proximidade com terrenos baldios			
Sim	77,53	48	0,004**
Não	52,88	57	0,63
Destino adequado do lixo			
Sim	52	52	0,52
Não	70	70	0,10

625 * (χ^2) teste de qui-quadrado, (*P*) probabilidade de ocorrência ao acaso626 ** valores significativos considerando-se $P \leq 0,05$.

627

628 Tabela 2

629 Percentual de residências com rede de esgoto em relação aos resultados
 630 sorológicos de anticorpos anti-leptospira em cães, distribuídos na área urbana do
 631 município de Ilhéus, BA

632

% de residências com rede de esgoto	Pontos com animais não- reagentes		Pontos com animais reagentes		Total de pontos observados	
		%		%		%
2,20-24,49	9	12.50	1	1.39	10	13.89
24,5-54,07	12	16.67	4	5.56	16	22.22
54,08-75,82	8	11.11	2	2.78	10	13.89
75,83-91,30	14	19.44	3	4.17	17	23.61
91,31-100	14	19.44	5	6.94	19	26.39
TOTAL	57	79.17	15	20.83	72	100

633 $X^2=1,35$, $P=0,8554$

634

635 Tabela 3

636 Percentual de residências com rede de esgoto em relação aos resultados
 637 sorológicos de anticorpos anti-leptospira em cães, distribuídos na área urbana do
 638 município de Ilhéus, BA

639

% de residências com fossa séptica	Pontos com animais não- reagentes		Pontos com animais reagentes		Total de pontos observados	
		%		%		%
0-3,485	20	27.78	7	9.72	27	37.50
3,486-9,633	17	23.61	3	4.17	20	27.78
9,634-24,45	8	11.11	2	2.78	10	13.89
24,46-52	6	8.33	3	4.17	9	12.50
52,01-89,39	6	8.33	0	0.00	6	8.33
TOTAL	57	79.17	15	20.83	72	100

640 $X^2=3,27$, $P=0,5132$

641

642 Tabela 4

643 Tipo de cobertura vegetal em relação aos resultados sorológicos de anticorpos anti-

644 leptospira em cães, distribuídos na área urbana do município de Ilhéus, BA

645

% de cobertura vegetal	Pontos com animais não- reagentes		Pontos com animais reagentes		Total de pontos observados	
		%		%		%
Mata	15	20.83	5	6.94	20	27.78
Mangue	1	1.39	2	2.78	3	4.17
Ausência de cobertura Vegetal	41	56.94	8	11.11	49	68.06
TOTAL	57	79.17	15	20.83	72	100

646 $X^2=4,63$, $P=0,09$

1 **Soro-epidemiologia da *Leptospira* spp. em cães do município de Ilhéus, BA ,**
2 **Brasil: Sorovares, implicações para vacinação e saúde pública***

3 *Seroepidemiology of Leptospira spp. in dogs on the city of Ilhéus, Bahia, Brazil:*
4 *serovars, implications for vaccination and public health **

5

6 **Manuella de Oliveira Lavinsky¹, Roueda Abou Said¹ **, Gil Marcelo Reuss**
7 **Strenzel¹, Helio Langoni²**

8

9 ¹ Universidade Estadual de Santa Cruz, Departamento de Ciências Agrárias e
10 Ambientais, Ilhéus, Bahia, Brasil.

11 ² Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho Faculdade de Medicina
12 Veterinária e Zootecnia, Botucatu, São Paulo, Brasil.

13

14

15 **Autor para correspondência:

16 Roueda Abou Said, Dra.

17 Universidade Estadual de Santa Cruz, Rod. Ilhéus/Itabuna, km 16, Departamento de

18 Ciências Agrárias e Ambientais

19 45662 - 900, Ilhéus, Bahia, Brasil

20 Phone: + 55 - 73 - 36805406

21 E-mail: roueda@uol.com.br

22 | **Resumo**

23 O presente estudo objetivou investigar a ocorrência de anticorpos anti-*Leptospira*
24 spp. em cães do município de Ilhéus, BA, Brasil, em três condições distintas, animais
25 domiciliados da zona urbana (n = 282), animais domiciliados da zona rural (n = 77) e
26 animais errantes (n = 51). Para tanto, utilizou-se a técnica de soroaglutinação
27 microscópica (SAM), empregando-se uma coleção de 24 variantes sorológicas. Os
28 resultados indicaram que a frequência de anticorpos anti-leptospira observada nos
29 cães da zona urbana foi de 7,1%, na zona rural foi de 16,9%, e em cães errantes foi
30 de 23,5%, quando consideradas reações para qualquer um dos sorovares.
31 Observou-se diferença significativa entre as frequências das três populações
32 estudadas ($P < 0,0001$). Dos sorovares testados, o sorovar Copenhageni foi o mais
33 freqüente na zona urbana (35%) e nos cães errantes (41,7%). Na zona rural, o
34 sorovar mais freqüente foi o Bratislava (46,2%). Estes resultados refletem as
35 diferenças nas questões epidemiológicas destas populações, sobretudo em relação
36 aos fatores de risco e aos hospedeiros associados com a disseminação da
37 leptospirose. Também demonstra que os cães deste município, independente da sua
38 localização, podem ser fontes de infecção para leptospirose, o que desperta
39 preocupação do ponto de vista de saúde pública, por se tratar de uma importante
40 zoonose. Ressalta-se a importância do desenvolvimento de estudos sobre
41 leptospirose em condições e ambientes distintos de um mesmo município, para que
42 sejam melhores compreendidos seus aspectos epidemiológicos, e traçadas medidas
43 de controle e prevenção para esta enfermidade.

44 **Palavras-chaves:** epidemiologia, zoonose, leptospirose.

45 Abstract

46 This study aimed to investigate the occurrence of antibodies anti-*Leptospira* spp. in
47 dogs on the city of Ilhéus, Bahia, Brazil, in three different conditions, house dogs in
48 the urban area (n = 282), house dogs in the rural area (n = 77) and stray dogs (n =
49 51). The microscopic agglutination test (MAT) was used, with a collection of 24
50 serovars. The results indicated that the frequency of anti-leptospira observed in
51 house dogs in the urban area was 7.1%, in dogs from rural areas was 16.9%, and
52 stray dogs was 23.5%, considering the reactions for any of the serovars. There was
53 significant difference between the frequencies of three studied populations (P
54 <0.0001). Of the serovars tested, the Copenhageni was the most frequent in urban
55 area (35%) and in stray dogs (41.7%). The most frequent serovar in rural areas was
56 Bratislava (46.2%). These results reflect the differences in epidemiology of these
57 populations, particularly concerning about risk factors and the hosts associated with
58 the spread of leptospirosis. They also demonstrate that dogs of this city, regardless
59 of their location, can be a source of leptospirosis infection, an important zoonosis that
60 need a special attention on the Public Health. We highlight the importance of
61 leptospirosis studies on different environments at the same city, for the best
62 understood of epidemiological features, and for the establishment of preventive
63 actions to control this disease.

64 Keywords: epidemiology, zoonosis, leptospirosis.

65

66 **Introdução**

67 A leptospirose é considerada uma zoonose emergente de distribuição
68 mundial, causada por diferentes sorovares da bactéria *Leptospira* spp., acometendo
69 mamíferos (Levett, 2007; Adler & Moctezuma, 2009). Os animais infectados
70 excretam os microorganismos pela urina, contaminando o meio ambiente. Se as
71 condições de temperatura e umidade (Dias et al., 2007; Reis et al., 2008) forem
72 favoráveis à sobrevivência desta bactéria no ambiente, estas se multiplicam e
73 constituem fator de risco à infecção de outros animais, inclusive ao homem (WHO,
74 2003).

75 No Brasil, a leptospirose humana é endêmica nos principais centros urbanos
76 (Sarkar et al., 2002; Tassinari et al., 2004; Reis et al., 2008), e surtos sazonais
77 ocorrem durante períodos de alta pluviosidade (Barcellos e Sabroza, 2001; Barcellos
78 et al., 2003; Tassinari et al., 2008). Segundo dados do ministério da Saúde, entre os
79 anos de 1997 e 2008, foram registrados 39677 casos de leptospirose humana, com
80 índice de letalidade variando de 8,5 a 12,7% (BRASIL, 2009).

81 Para a compreensão dos aspectos epidemiológicos relacionados à
82 leptospirose, o reconhecimento dos hospedeiros de manutenção é de fundamental
83 importância, uma vez que estes participam da disseminação do agente no meio
84 ambiente (Horsh, 1999). Dentre os hospedeiros de manutenção da leptospirose, os
85 roedores são aqueles mais relacionados com a sua disseminação. No entanto, os
86 cães vêm exercendo papel importante na epidemiologia desta enfermidade, devido
87 ao estreito contato mantido com o homem (Schreiber et al., 2005; Minke et al.,
88 2009).

89 Objetivou-se a partir deste trabalho estimar a ocorrência de anticorpos anti-
90 *Leptospira* spp., em três populações de cães distintas do município de Ilhéus, BA,

91 Brasil: domiciliados da zona urbana, domiciliados da zona rural e errantes.
92 Determinou-se ainda a frequência dos principais sorovares envolvidos nesta
93 infecção.

94

95 **Material e métodos**

96 *Local e população de estudo*

97 O estudo foi realizado no município de Ilhéus, estado da Bahia, localizado na
98 região nordeste do Brasil (14° 47' 20" de latitude sul e 39° 02' 56" de longitude
99 oeste), com área territorial de 1.840, 991km². Essa região possui clima tropical, com
100 temperaturas entre 20° e 24° e regime pluviométrico anual superior a 1500-2000 mm
101 (IBGE, 2002).

102 A pesquisa foi conduzida entre os meses de janeiro a dezembro de 2008. Foi
103 realizado um estudo transversal para determinar a soroprevalência e os sorovares
104 implicados na infecção canina por *Leptospira* spp. em três populações de cães: zona
105 urbana, zona rural e errantes.

106 Para cálculo da amostra, a população total de cães foi estimada a partir da
107 população humana do município que é de 220.093 habitantes. Foi utilizada a relação
108 de 1:10 para o cálculo de proporção cão/homem, que redundou em 22.093 animais.
109 O cálculo da amostra foi realizado pelo programa EpiInfo 3.3.2, considerando-se um
110 nível de confiança de 95%, prevalência esperada de 20% e erro estatístico de 5%,
111 resultando no N amostral de 243.

112 Baseado nos dados da população humana de Ilhéus, verificou-se que a
113 proporção entre zona urbana e rural era de 70:30, o que resultou no N amostral de
114 171 e 72 animais respectivamente. Na zona urbana, o N amostral foi ampliado para
115 282 para que houvesse uma distribuição homogênea da população de cães. Na

116 zona rural, o N também sofreu ampliação, passando para 77, caso alguma amostra
117 fosse perdida. Para a população de cães errantes, foi estabelecido um N amostral
118 de 51 cães.

119

120 *Inquérito sorológico, colheita sanguínea e processamento das amostras*

121 O trabalho foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em experimentação
122 animal da Universidade de Santa Cruz (UESC), sob o protocolo nº 022/08.

123 Antes da colheita sanguínea dos cães, os proprietários tomaram conhecimento
124 sobre o estudo, cujo consentimento de participação foi comprovado pela assinatura
125 do termo de ciência e autorização.

126 Para os proprietários dos cães domiciliados, da zona urbana e rural, foram
127 ainda aplicados questionários estruturados, contendo informações sobre a
128 imunização dos cães contra leptospirose.

129 De cada animal, foi colhido cerca de 10 mL de sangue, mediante punção
130 venosa cefálica ou jugular, com seringa descartável de 10 mL e agulha 30 x 8 mm.
131 Este sangue foi processado no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital
132 Veterinário da UESC (Universidade Estadual de Santa Cruz), onde foi centrifugado a
133 3000 rpm por 10 minutos, para obtenção do soro. O soro obtido foi acondicionado
134 em microtubo de plástico de 1,5 ml e mantido em freezer a -20°C até o momento da
135 realização da técnica de soroaglutinação microscópica (SAM).

136 A detecção de anticorpos anti-*Leptospira* spp. foi realizado pela SAM,
137 segundo as normas do Ministério da Saúde (BRASIL, 1995), empregando-se 24
138 sorovares (Australis, Bratislava, Autumnalis, Butembo, Castellonis, Bataviae,
139 Canicola, Whitcombi, Cynopteri, Djasiman, Sentot, Grippytyphosa, Hebdomadis,
140 Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Panama, Patoc, Pomona, Pyrogenes,

141 Hardjo, Wolffi, Shermani e Tarassovi), mantidos no laboratório do Serviço de
142 Diagnóstico de Zoonoses, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
143 (FMVZ), da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu, SP, em
144 meio de cultura semi-sólido de Fletcher e líquido de Ellinghausen-McCullough-
145 Jonhson-Harris (EMJH) com albumina bovina Fração V, segundo Cohn, a 30°C, e
146 mantidos por repiques semanais.

147 Os soros foram triados na diluição de 1:100, e aqueles que apresentaram
148 50% ou mais de aglutinação foram titulados pelo exame de uma série de diluições
149 geométricas de razão dois. O título do soro foi a recíproca da maior diluição que
150 apresentou resultado positivo. Os antígenos foram examinados ao microscópio de
151 campo escuro, previamente aos testes, a fim de verificar a mobilidade e a presença
152 de auto-aglutinação ou de contaminantes. Caso um animal reagisse para dois ou
153 mais sorovares, ele era considerado positivo para o sorovar de maior título.
154 Considerou-se como ponto de corte, no presente estudo, o título de anticorpos anti-
155 *Leptospira* spp. iguais ou superiores a 1:100.

156

157 *Análise estatística*

158 O teste de tendência linear do Qui-quadrado foi utilizado para avaliar as
159 diferenças entre as três populações de cães estudadas. Essa análise foi realizada
160 no programa Epiinfo 3.3.2, adotando um nível de 5% de significância.

161 **Resultados**

162 Neste estudo, a frequência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. observada nos
163 cães da zona urbana foi de 7,1%, nos cães da zona rural foi de 16,9%, e em cães
164 errantes foi de 23,5%, quando consideradas reações para quaisquer dos sorovares
165 utilizados como antígeno (Tabela 1). Pelo teste de tendência linear do Qui-quadrado,
166 obteve-se $X^2= 15,157$, verificando que houve diferenças significativas entre as
167 populações estudadas ($P < 0,0001$).

168 Dos sorovares testados, o sorovar copenhageni foi o mais freqüente nas
169 populações de cães domiciliados na zona urbana, como também naqueles cães
170 errantes. Na zona rural, o sorovar mais freqüente foi o sorovar Bratislava (figura 1).
171 Houve dois casos de co-aglutinação nos cães domiciliados na zona urbana e seis
172 casos na zona rural, sendo estes apresentados na tabela 2. Não houve casos de co-
173 aglutinação em cães errantes.

174 O teste de tendência linear em relação à vacinação dos cães, comparando-
175 se a população domiciliada urbana e a rural, obteve $X^2= 0,689$, verificando que não
176 houve diferença estatística significativa ($P=0,40661$). Os valores de odds ratio para
177 os cães da zona urbana foram 1.00 quando vacinados e 1.47 para os não-
178 vacinados. Para cães da zona rural, os valores foram 6.00 para aqueles vacinados e
179 2.94 quando não-vacinados.

180 **Discussão**

181 A leptospirose constitui-se em um importante problema de saúde pública,
182 sendo emergente em vários países, inclusive no Brasil. Neste estudo, constatou-se a
183 ocorrência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em cães do município de Ilhéus, sendo
184 observadas diferenças significativas entre a freqüência destes anticorpos, em
185 relação às três populações avaliadas.

186 Estes resultados refletem as diferenças nas questões epidemiológicas destas
187 populações, sobretudo em relação aos fatores de risco e aos hospedeiros
188 associados com a disseminação da leptospirose. Segundo Gheim et al. (2007),
189 condições de saneamento básico, contato com roedores, proximidade com áreas
190 que possuam animais silvestres constituem-se como importantes fatores de risco
191 desta enfermidade.

192 A maior freqüência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. neste estudo foi
193 observada na população de animais errantes, que possuem fácil acesso ao lixo e
194 maior exposição aos ambientes contaminados com a urina de animais infectados,
195 sobretudo de roedores. Este risco torna-se maior em áreas com baixas condições de
196 saneamento básico. Neste sentido, estima-se que menos de 50% da população do
197 município de Ilhéus tenha acesso à rede de esgoto (IBGE, 2002).

198 A maior freqüência observada para o sorovar Copenhageni nas populações
199 de cães errantes e naqueles domiciliados da zona urbana, aponta para a
200 participação dos roedores sinantrópicos na transmissão da *Leptospira* spp. neste
201 município, indicando a necessidade de controle da população de roedores. Para que
202 haja o efetivo controle, as ações não devem ser apenas direcionadas para o
203 extermínio desses animais, mas também devem visar o conhecimento de sua

204 biologia, hábitos comportamentais, habilidades e capacidades físicas associado ao
205 ambiente onde estão instalados (FUNASA, 2002).

206 Além disso, é recomendável a inclusão do sorovar Copenhageni na bateria
207 de antígenos dos testes sorológicos para cães e humanos em que haja a suspeita
208 desta enfermidade, uma vez que surtos de leptospirose humana em diversas partes
209 do país têm sido atribuídos a esse sorovar (Sarkar et al., 2002; Romero et al., 2003;
210 Brod et al., 2005; Maciel et al., 2008; Reis et al., 2008).

211 Reações cruzadas entre o sorovar Copenhageni e o sorovar
212 Icterohaemorrhagiae seriam esperadas, pois ambos pertencem a mesmo sorogrupo
213 e possuem os roedores como hospedeiro de manutenção (Levett, 2001). A
214 inexistência de anticorpos reagentes ao sorovar Icterohaemorrhagiae nas três
215 populações estudadas pode indicar que nesta região outros fatores epidemiológicos
216 estejam envolvidos com a disseminação da leptospirose, sobretudo no que condiz
217 aos hospedeiros acometidos.

218 No meio rural, diferentes espécies animais compartilham o mesmo ambiente,
219 o que pode promover a associação e adaptação de agentes aos novos hospedeiros.
220 Nos cães domiciliados na zona rural, o sorovar Bratislava foi o mais encontrado,
221 possivelmente devido à exposição destes com animais de produção (Araújo et al.,
222 2005; Mineiro et al., 2007; Chiareli et al., 2008) ou até mesmo silvestres (Girio et al.,
223 2004; Jung et al., 2007). Foi observado também que 10% dos animais domiciliados
224 na zona urbana foram reagentes a este sorovar. Este fato pode estar associado ao
225 constante processo de urbanização, uma vez que o crescimento das aglomerações
226 urbanas, em ambientes antes rurais, somados à baixa infra-estrutura sanitária,
227 aumentam o risco de infecção por *Leptospira* spp., tornando assim, possível a
228 adaptação desses microorganismos a outros hospedeiros.

229 Assim como o sorovar Bratislava, reações para o sorovar javanica seriam
230 mais esperadas em ambientes rurais e silvestres. Bolin (1996) considera que os
231 cães sejam hospedeiros acidentais deste sorovar, uma vez que estes possuem os
232 animais silvestres como hospedeiros de manutenção, que servem como reservatório
233 para infecção (Ward, 2002; Greene et al., 2006).

234 O contato direto ou indireto com a urina dos hospedeiros de manutenção
235 pode causar infecção em outras espécies. Neste sentido, a região sul da Bahia
236 conserva a parcela mais significativa da Mata Atlântica no Nordeste do Brasil,
237 apresentando grande diversidade de animais silvestres, incluindo espécies
238 endêmicas (Campanili; Prochrow, 2006). O que pode justificar a ocorrência destes
239 sorovares em animais errantes ou naqueles domiciliados na zona urbana. É
240 importante ressaltar que existem variações entre os hospedeiros de manutenção em
241 relação à localização geográfica. Tal fato justifica a necessidade de trabalhos
242 epidemiológicos em regiões distintas, para que haja uma melhor compreensão desta
243 enfermidade (Levett, 2001).

244 A frequência de anticorpos para o sorovar Patoc, observada nos cães deste
245 estudo, possivelmente decorre de reações cruzadas, uma vez que este representa
246 um sorovar apatogênico, que apresenta reações cruzadas com diversos sorovares
247 patogênicos (Aguiar et al., 2006; Aguiar et al., 2008). Sabe-se que sorovares
248 antigenicamente relacionados são capazes de induzir reações cruzadas, sem
249 necessariamente possuírem uma implicação clínica ou epidemiológica comum
250 (Rosseti et al., 2005).

251 Entretanto, em um dos cães da zona urbana, observou-se altos títulos do
252 sorovar Patoc (1:3200), com reação cruzada para os sorovares Castellonis (1:400),
253 Sentot (1:400). O referido animal apresentava manifestação clínica compatível com

254 leptospirose, sendo caracterizada por insuficiência renal aguda. Destaca-se que a
255 maior titulação observada foi em relação a um sorovar saprófita, que não provocaria
256 reações ao seu hospedeiro (Levett, 2001). Este resultado pode indicar um potencial
257 patogênico deste sorovar, ou representar uma reação antigênica a um sorovar não
258 avaliado, o que requer mais estudos.

259 Neste estudo, o sorovar Canicola ocorreu em baixa frequência nas três
260 populações estudadas, em torno de 9%, e em todos os casos apresentando reações
261 com baixos títulos de anticorpos (1:100). Esta titulação geralmente associa-se à
262 prévia infecção ou vacinação (Greene et al., 2006). Alguns trabalhos apontam para
263 um decréscimo na ocorrência destes sorovares em populações de cães, devido à
264 imunização dos animais com esta bacterina (Silva et al., 2006; Aguiar et al., 2007).
265 Ainda que em baixa frequência, o achado do sorovar Canicola alerta para o fato de o
266 cão se constituir como importante fonte de infecção da doença para o homem, uma
267 vez que o cão representa o principal hospedeiro de manutenção desse sorovar
268 (Greene et al., 2006).

269 Uma das formas mais recomendadas para prevenir a leptospirose é pela
270 imunização dos cães. Contudo, nem sempre esta imunização é bem sucedida, pois
271 não abrange a maioria da população canina; é conferida por um curto período de
272 duração (entre 6 a 14 meses); e por ser sorovar específica, não há imunização
273 cruzada com outros sorovares (André-Fontaine, 2006; Greene et al., 2006;
274 Srivastava, 2006; Minke et al., 2009).

275 Neste estudo, dentre os cães soropositivos na zona urbana e rural, verificou-
276 se que 5,2% e 6,5%, respectivamente, receberam vacinação pelo menos uma vez
277 até o momento do estudo. Essa baixa taxa de prevenção reflete a necessidade de
278 conscientizar os proprietários sobre os fatores de risco associados à doença, e a

279 importância de enfatizar a prática da imunização dos cães como medida preventiva
280 da leptospirose, uma vez que já são disponíveis vacinas que protegem contra a
281 manifestação clínica da doença e o estado de portador renal (Klassen et al., 2003;
282 Schreiber et al., 2005).

283

284 **Conclusões**

285 Os dados apresentados no presente estudo demonstram que os cães do
286 município de Ilhéus, Estado da Bahia, independente da sua localização podem ser
287 fontes de infecção de leptospirose, o que desperta preocupação do ponto de vista de
288 saúde pública, por se tratar de uma importante zoonose. A frequência dos sorovares
289 variou conforme a população estudada, revelando a importância do desenvolvimento
290 de estudos sobre leptospirose em condições e ambientes distintos de um mesmo
291 município, para que sejam melhor compreendidos seus aspectos epidemiológicos, e
292 traçadas medidas de controle e prevenção para esta enfermidade. É importante
293 salientar ainda sobre a necessidade de se controlar a população de cães errantes,
294 pelo controle da reprodução e estímulo da posse responsável.

295 **Referências Bibliográficas**

- 296 Adler, B., Moctezuma, A.P., 2009. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol.* Doi:
297 10.1016/j.vetmic.2009.
- 298 Aguiar, D.M., Cavalcante, G.T., Lara, M.C.C.S.H., Villalobos, E.M.C., Cunha, E.M.S.,
299 Okuda, L.H., Stefano, E., Nassar, A.F.C., Souza, G.O., Vasconcellos, S.A., Labruna,
300 M.B., Camargo, L.M., Gennari, S.M., 2008. Prevalência de anticorpos contra agentes
301 virais e bacterianos em eqüídeos do município de Monte Negro, Rondônia,
302 Amazônia Ocidental Brasileira. *Braz. J.vet. Res. Anim. Sci.* 45, 296-276.
- 303 Aguiar, D.M., Cavalcante, G.T., Marvulo, M.F.V., Silva, J.C.R., Pinter, A.,
304 Vasconcellos, S.A., Morais, Z.M., Labruna, M.B., Camargo, L.M.A, Gennari, S.M.,
305 2007. Fatores de risco associados à ocorrência de anticorpos anti-*Leptospira* spp.
306 em cães do município de Monte Negro, Rondônia, Amazônia Ocidental Brasileira.
307 *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 59, 70-76.
- 308 Aguiar, D.M., Gennari, S.M., Cavalcante, G.T., Labruna, M.B., Vasconcellos, S.A.,
309 Rodrigues, A.A.R., Moraes, Z.M., Camargo, L.M.A., 2006. Seroprevalence of
310 *Leptospira* spp. in cattle from Monte Negro municipality, Western Amazon, Brazil.
311 *Pesq. Vet. Bras.* 26, 102-104.
- 312 André-Fontaine, G. 2006. Canine leptospirosis—Do we have a problem? *Vet*
313 *Microbiol.* 117, 19-24.
- 314 Araújo, V.E.M., Moreira, E.C., Naveda, L.A.B., Silva, J.A., Contrenas, R.L., 2005.
315 Freqüência de aglutininas anti-*Leptospira interrogans* em soros sanguíneos de
316 bovinos, em Minas Gerais, de 1980 a 2002. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 57, 430-
317 435.

- 318 Barcellos, C., Lammerhirt, C.B., Almeida, M.A.B., Santos, E., 2003. Distribuição
319 espacial da leptospirose no Rio Grande do Sul, Brasil: recuperando a ecologia dos
320 estudos ecológicos. *Cad Saude Publica* 19, 1283-1292.
- 321 Barcellos, C., Sabroza, P.C., 2001. The place behind the case: leptospirosis risks and
322 associated environmental conditions in a flood-related outbreak in Rio de Janeiro.
323 *Cad Saude Publica*, 17, 59-67.
- 324 Bolin, C.A., 1996. Diagnosis of leptospirosis: reemerging disease of companion
325 animals. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 11, 166-171.
- 326 Brasil (2 ed), 1995. Manual de leptospirose. Fundação Nacional de Saúde, Brasília.
- 327 Brod, C.S., Aleixo, J.A.G., Jouglard, S.D.D., Fernandes, C.P.H., Texeira, J.L.R.,
328 Dellagostin, O.A., 2005. Evidência do cão como reservatório da leptospirose
329 humana: isolamento de um sorovar, caracterização molecular e utilização em
330 inquérito sorológico. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 38, 294-300.
- 331 Campanili, M., Prochrow, M., (1 ed) 2006. Mata Atlântica – uma rede pela floresta.
332 RMA, Brasília. ISBN: 85-99824-01-5.
- 333 Chiareli, D., Moreira, E.C., Gutiérrez, H.O.D., Rodrigues, R.O., Marcelinho, A.P.;
334 Meneses, J.N.C., Almeida, V.M.A., 2008. Frequência de aglutininas anti-*Leptospira*
335 *interrogans* em eqüídeos em Minas Gerais, 2003 a 2004. *Arq. Bras. Med. Vet.*
336 *Zootec.* 60, 1576-1579.
- 337 Dias, J.P., Texeira, M.G., Costa, M.C.N., Mendes, C.M.C., Guimarães, P., Reis,
338 M.G., Ko, A.; Barreto, M.L., 2007. Factors associated with *Leptospira* sp infection in a
339 large urban Center in northeastern Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 40, 499-504.
- 340 Funasa (1 ed), 2002. Manual de controle de roedores. Fundação Nacional de Saúde,
341 Brasília.

- 342 Horsch, F., 1999. Leptospirose. In: BEER, J. Doenças infecciosas em Animais
343 Domésticos. Rocca, São Paulo, pp. 394.
- 344 Ghneim, G.S., Viers, J.H., Chomel, B.B.; Kass, P.H.; Descollonges, D.A.; Johnson,
345 M.L., 2007. Use of a case-control study and geographic information systems to
346 determine environmental and demographic risk factors for canine leptospirosis. Vet.
347 Res. 38, 37-50.
- 348 Girio, R.J.S., Pereira, F.L.G.; Marchiori Filho, M., Mathia, L.A.; Herrera, R.C.P;
349 Alessi, A.C.; Girio, T.M.S., 2004. Pesquisa de anticorpos contra *Leptospira* spp. em
350 animais silvestres e em estado feral da região de Nhecolândia, Mato Grosso do Sul,
351 Brasil. Utilização da técnica de imuno-histoquímica para detecção do agente. Cienc
352 Rural 34, 165-169.
- 353 Greene, C.E., Sykes, J.E., Brown, C.A., Hartmann, K., 2006. Leptospirosis. In:
354 Greene,C.E. (3 Ed), Infectious disease of the dog and cat. Saunders, Missouri,
355 pp.402-417.
- 356 IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2002. Base de informações por
357 setor censitário. CD-ROM. Rio de Janeiro: IBGE.
- 358 Jung, B.Y., Choi, J.S., Kim, K.T., Song, Y.K, Lee, S.H., Lee, K.W., KIM, J.Y., Moon,
359 O.K., 2007. Seroprevalence of Leptospirosis in Korean Municipal Zoo Animals. J.
360 Vet. Med.Sci. 69, 861-863.
- 361 Klassen, H.L.B.M., Molkenboer, M.J.C.H., Vrijenhoek, M.P., Kaashoek, M.J., 2003.
362 Duration of immunity in dogs vaccinated against leptospirosis with a bivalent
363 inactivated vaccine. Vet Microbiol 95, 121-132.
- 364 Levett, P.N., 2007. Sequence-based typing of *Leptospira*: epidemiology in the
365 genomic era. PLoS Negl Trop Dis. Doi: 10.1371/journal.pntd.0000120.
- 366 Levett, P.N., 2001. Leptospirosis. Clin Microbiol Rev 14, 296–326.

- 367 Maciel, E.A.P., Carvalho, A.L.F., Nascimento, S.F., Matos, R.B., Gouveia, E.L., Reis,
368 M.G., Ko, A.I., 2008. Household transmission of *Leptospira* infection in urban slum
369 communities. Plos Negl Trop Dis. Doi:10.1371/journal.pntd.0000154.
- 370 Mineiro, A.L.B.B., Bezerra, E.E.A., Vasconcellos, S.A., Costa, F.A.L., Macedo, N.A.,
371 2007. Infecção por *Leptospira* em bovinos e sua associação com transtornos
372 reprodutivos e condições climáticas. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 59, 1103-1109.
- 373 BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doenças Transmissíveis: Leptospirose.
374 Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21922>.
375 Acesso em: 20/10/2008.
- 376 Minke, J.M., Bey, R., Tronel, J.P., Latour, S., Colombet, G., Yvarel, J., Cariou, C.,
377 Guiot, A.L., Cozette, V., Guigal, P.M., 2009. Onset and duration of protective
378 immunity against clinical disease and renal carriage in dogs provided by a bi-valent
379 inactivated leptospirosis vaccine. Vet Microbiol 137, 137-145.
- 380 Reis, R.B., Ribeiro, G.S, Felzemburgh, R.D.M., Santana, F.S., Mohr, S., Melendez,
381 A.X.T.O, Queiroz, A., Santos, A.C., Ravines, R.R., Tassinari, W.S., Carvalho, M.S.
382 Reis, M.G., Ko, A.I., 2008. Impact of environmental and social gradient on *Leptospira*
383 infection in urban slums. PLoS Negl Trop Dis. Doi:10.1371/journal.pntd.0000228.
- 384 Romero, E.C., Bernado, C.C.M., Yasuda, P.H., 2003. Human leptospirosis: a twenty-
385 nine-year serological study in São Paulo, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. 45, 245-248.
- 386 Rossetti, C.A., Liem, M., Samartino, L.E., Hartskeerl, R.A., 2005. Buenos Aires, a
387 new *Leptospira* sorovar of serogroup Djasiman, isolated from an aborted dog fetus in
388 Argentina. Vet Microbiol 107, 241-248.
- 389 Sarkar, U., Nascimento, S.F., Barbosa, R., Martins, R., Nuevo, H., Kalafanos, I.,
390 Grunstein, I., Flannery, B., Dias, J., Riley, L.W., Galvão Reis, M., Ko, I.A., 2002. A

391 population-based case-control investigation of risk factors for leptospirosis during an
392 urban epidemic. Am J Trop Med Hyg 66, 605-610.

393 Schreiber, P., Martin, V., Najbar, W., Sanquer, A., Gueguen, S., Lebreux, B., 2005.
394 Prevention of renal infection and urinary shedding in dogs by a *Leptospira*
395 vaccination. Vet Microbiol 108, 113-118.

396 Silva, W.B., Simões, L.B., Lopes, A.L.S., Padovani, C.R., Langoni, H., Modolo, J.R.,
397 2006. Avaliação de fatores de risco de cães sororreagentes à *Leptospira* spp. e sua
398 distribuição espacial, em área territorial urbana. Braz. J. vet. Res. anim. Sci. 43, 783-
399 792.

400 Srivastava, S.K., 2006. Prospects of developing leptospiral vaccines for animals.
401 Indian J Med Microbiol 24,331-336.

402 Tassinari, W.S., Pellegrini, D.C.P., Sá, C.B.P., Reis, R.B., Ko, A.I., Carvalho, M.S.,
403 2008. Detection and modelling of case clusters for urban leptospirosis. Trop Med Int
404 Health 13, 503-512.

405 Tassinari, W.S., Pellegrini, D.S.P.P., Sabroza, P.C., Carvalho, M.S., 2004.
406 Distribuição espacial da leptospirose no Município do Rio de Janeiro, Brasil, ao longo
407 dos anos de 1996-1999. Cad Saude Publica, 20, 1721-1729.

408 Ward, M.P., 2002. Seasonality of canine leptospirosis in the United States and
409 Canada and its association with rainfall. Prev Vet Med 56, 203-213.

410 WHO (World Health Organization). Human leptospirosis: Guidance for diagnosis,
411 surveillance and control. 2003. Disponível em:
412 <http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.23.pdf>. Acesso em:
413 20 set. 2007.

414

415 Tabela 1

416 Distribuição dos sorovares e suas respectivas porcentagens, determinados pelo
 417 teste de soroaglutinação microscópica, em diferentes populações de cães do
 418 município de Ilhéus, BA.

419

Sorovares	Zona urbana	%	Zona rural	%	Cães errantes	%
autumnalis	2	10	-	-	-	-
bataviae	-	-	-	-	1	8,3
bratislava	2	10	6	46,2	-	-
butembo	-	-	1	7,7	-	-
canicola	2	10	1	7,7	1	8,3
castellonis	-	-	1	7,7	-	-
copenhageni	7	35	-	-	5	41,7
cynopteri	1	5	-	-	1	8,3
djasiman	1	5	-	-	-	-
gryppotyphosa	2	10	-	-	-	-
hardjo	-	-	-	-	1	8,3
hebdomadis	-	-	1	7,7	-	-
javanica	1	5	-	-	2	16,7
patoc	2	10	3	23,1	-	-
pyrogenes	-	-	-	-	1	8,3
total	20/282	-	13/77	-	12/51	-

420

421 Tabela 2

422 Reações cruzadas de anticorpos anti-leptospira detectadas pelo teste de
 423 soroaglutinação microscópica em diferentes populações de cães do município de
 424 Ilhéus, BA

População de cães	Cães soropositivos	Sorovares reagentes	Sorovares de menor título	Menores Títulos
Rural	1	bratislava/ hardjo	Hardjo	100
	1	bratilasva/ autumnalis	Autumnalis	100
	2	bratislava/ castellonis	Castelonis	100
	1	canicola/castellonis	Castelonis	100
	1	castellonis/sentot/pat oc	castellonis, sentot	400/400
Urbana	1	autumnalis/bratislava /canicola	bratislava, canicola	100/100
	1	bratislava/ javanica	Javanica	100

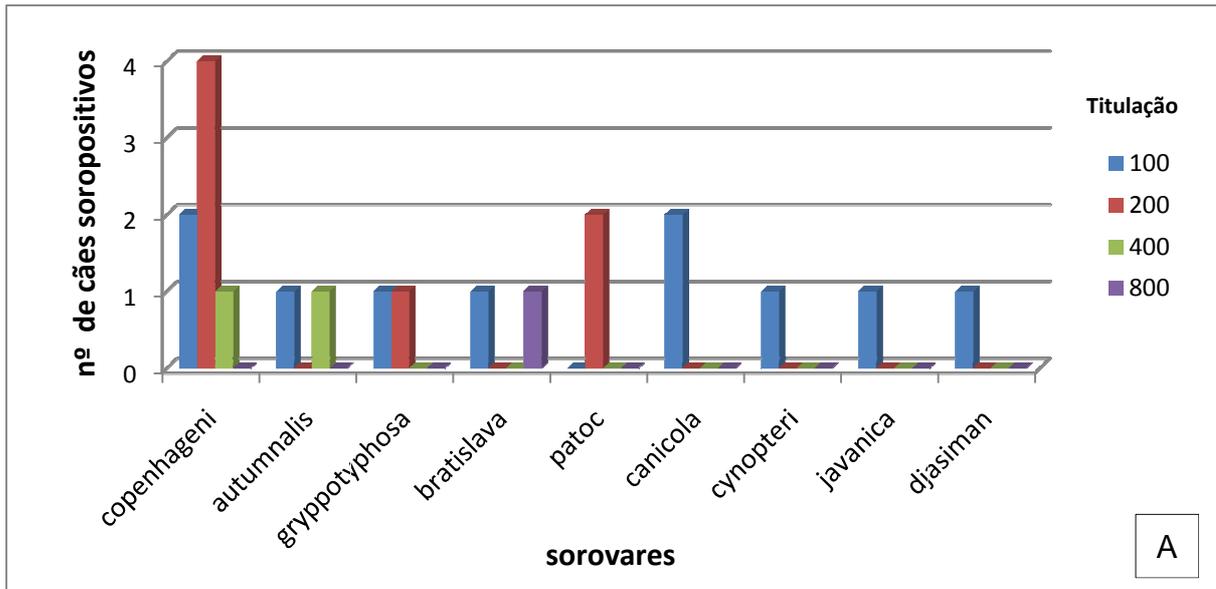
425

426 Tabela 3

427 Associação entre a reatividade ao teste de soroaglutinação microscópica e a
 428 vacinação para leptospirose, em cães domiciliados da zona urbana e da zona rural
 429 do município de Ilhéus, BA

	Reagentes	Não-reagentes	Total	Odds ratio
zona urbana				
vacinados	3	54	57	1
não-vacinados	17	208	225	1.47
zona rural				
vacinados	5	15	20	6
não-vacinados	8	49	57	2.94

430



431

432

433

434

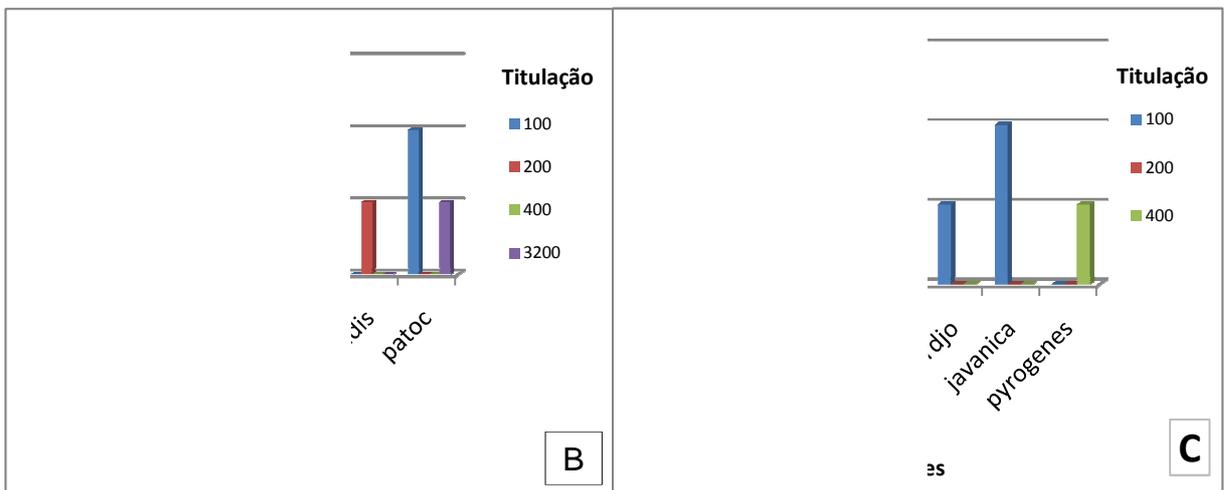
435

436

437

438

439



440 Fig. 1. Reatividade ao teste de soroaglutinação microscópica, de acordo com
 441 soroavares e seus respectivos títulos aglutinantes anti-leptospira, em cães do
 442 município de Ilhéus-BA. A- domiciliados na zona urbana. B- domiciliados na zona
 443 rural. C- cães errantes.

ANEXO 01

Identificação: _____

TERMO DE CIÊNCIA E AUTORIZAÇÃO

Eu, _____ portador (a) do RG/CPF número _____ declaro para os devidos fins legais que estou ciente e autorizo o animal _____ da espécie canina, raça _____, sexo _____, idade _____, a participar da pesquisa “Soroprevalência e fatores de risco associados a leptospirose canina no município de Ilhéus, Bahia”, sob coordenação da Prof^a Roueda Abou Said e a da estudante da pós-graduação Manuella Oliveira Lavinsky, que consiste na coleta de amostra sanguínea do cão com a aplicação de um questionário com relação aos fatores de risco associados a doença. A leptospirose é uma doença infecto-contagiosa emergente em países tropicais, que acomete seres humanos e animais domésticos e silvestres. Constitui-se como uma zoonose, sendo roedores e cães as principais fontes de transmissão desta enfermidade ao homem. Os resultados obtidos neste projeto estarão sujeitos às publicações científicas, em que o anonimato será garantido.

Ilhéus, _____ de _____ de 2008.

Assinatura do proprietário

QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO

1. Endereço: _____ nº _____ bairro: _____
 2. Porte: () pequeno () médio () grande () gigante 3. Telefone: _____
 4. Temperamento: () sanguíneo () linfático

5. PROFILAXIA DO ANIMAL

5.1. Vacinação: () sim () não

Se a resposta for sim: () óctupla () déctupla () antirábica () vacina não-ética () vacina leptospirose () outras qual/is _____

5.2. Se o animal recebeu a vacinou óctupla, déctupla ou vacina específica para leptospirose:

5.2.1. A. Qual marca da vacina? _____

5.2.2. B. Qual o protocolo de vacinação utilizado? _____

5.2.3. C. Quando foi a última vez que vacinou? _____

6. ALIMENTAÇÃO DO ANIMAL

6.1 Alimenta-se:

() comida caseira. Qual? _____

() ração. Qual? _____

6.2. Se for ração: () a granel () saco fechado

6.3. Após a abertura do pacote de ração, a ração fica: () no próprio pacote de ração () em vasilhame vedado

6.4 A alimentação é oferecida quantas vezes ao dia? () 1x () 2x () 3x () 4x

6.5 De modo geral, o animal come tudo de uma só vez? () sim () não

6.6 Os potes de alimento são lavados antes de colocar o alimento? () sim () não

Se a resposta for sim, pode-se dizer que é freqüente? () sim () não

6.7 O animal tem hábito de caça? () sim () não

O que ele costuma caçar? _____

6.8. Em relação à água ofertada:

6.8.A. Qual a origem da água que o animal bebe? () embasa () mineral () poço não artesiano () poço artesiano

6.9.B. A água é trocada ou substituída mais de uma vez ao dia? () sim () não

7. MANEJO DO ANIMAL

7.1 O animal toma banho de rio? () sim () não

7.2 O animal toma banho de mar? () sim () não

7.3 Faz uso de algum medicamento? () sim () não

Se sim, qual/is _____

7.4 Já apresentou doenças anteriormente? () sim () não.

Se a resposta for sim, qual/is _____

7.5 Sobre a ocorrência de ectoparasitas: () pulgas () carrapatos () ambos () nenhum

7.6 Status reprodutivo: () castrado () não-castrada () prenhe () não entrou no cio

Observações importantes (se necessário): _____

7.7 Aonde o animal faz xixi? () dentro de casa () quintal () rua () mata

7.8 O animal já apresentou sangue na urina? () sim () não

7.9 O animal já ficou com o corpo amarelo (ictérico) alguma vez? () sim () não

7.10 O animal possui contato com outros animais? () sim () não

Caso a resposta seja afirmativa. Qual/is? _____

7.11 O animal tem acesso à rua? () sim () não

Se a resposta for sim, o acesso a rua é supervisionado? () sim () não

7.12 Qual o tipo de ambiente que o animal vive?

() grama () terra () acimentado () piso () outros

7.13 O animal viaja/viajou para outra cidade? () sim () não

Se a resposta for sim, Qual (is) e quando? _____

8. HABITAÇÃO

8.1 A propriedade possui água encanada? () sim () não

8.2 A propriedade possui rede de esgoto? () sim () não

Se a resposta for sim, os dejetos vão para: () rio () fossa séptica () sistema de tratamento

Tem proximidade com esgoto a céu aberto? () sim () não

8.3 O lixo é recolhido diariamente por órgão responsável? () sim () não

Se a resposta for não, qual a frequência em que o lixo é coletado? () raro () uma vez por semana

() algumas vezes na semana () uma vez no mês () queimado

8.4. O animal já teve contato com o lixo da residência? () sim () não

Se a resposta for sim, é freqüente o contato com o lixo? () sim () não

8.5. A propriedade tem proximidade com áreas alagadas? () não () sim distância: _____

8.6. A propriedade tem proximidade com rios? () não () sim distância: _____

8.7 A propriedade tem proximidade com terrenos baldios? () não () sim distância: _____

8.8 A propriedade já sofreu com enchentes? () sim/quando _____ () não

8.9. O animal já estava na residência quando ocorreu a enchente? () sim () não

8.10. Roedores/ratos já apareceram na residência? () sim () não

Se a resposta for sim, é provável que eles tenham entrado em contato com o animal? () sim () não

Guide for Authors

An International Journal

Types of contribution

1. Original research papers (Regular Papers)
2. Review articles
3. Short Communications
4. Letters to the Editor
5. Book Reviews

Submission of manuscripts

Submission to *Veterinary Microbiology* now proceeds online via Elsevier Editorial System - ➔ <http://ees.elsevier.com/vetmic>. Submission to *Preventive Veterinary Medicine* now proceeds online via Elsevier Editorial System - ➔ <http://ees.elsevier.com/prevet>. Authors will be guided step-by-step through uploading files directly from their computers. Authors should select a set of classifications for their papers from a given list, as well as a category designation (Original Research Paper, Short Communication, and so on). Electronic PDF proofs will be automatically generated from uploaded files, and used for subsequent reviewing.

Authors are invited to suggest the names of up to 5 referees (with email addresses) whom they feel are qualified to evaluate their submission. Submission of such names does not, however, imply that they will definitely be used as referees.

Authors should send queries concerning the submission process or journal procedures to: AuthorSupport@elsevier.com. Authors can check the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

Authors submitting hard copy papers will be asked to resubmit using Elsevier Editorial System.

Submission of an article is understood to imply that the article is original and is not being considered for publication elsewhere. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content. Upon acceptance of the article by the journal, the author(s) will be asked to transfer the copyright of the article to the Publisher. This transfer will ensure the widest possible dissemination of information.

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Acknowledgements

All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance.

Conflict of interest

At the end of the text, under a subheading "Conflict of interest statement" all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding.

Role of the funding source

All sources of funding should be declared as an acknowledgement at the end of the text. Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for

publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should so state.

Ethics

Circumstances relating to animal experimentation must meet the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals as issued by the Council for the International Organizations of Medical Sciences. They are obtainable from: Executive Secretary C.I.O.M.S., c/o WHO, Via Appia, CH-1211 Geneva 27, Switzerland, or at the following URL: http://www.cioms.ch/frame_1985_texts_of_guidelines.htm. Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable to the Editors of *Veterinary Microbiology*.

Any new nucleotide or amino acid sequence data will be deposited in publicly accessible databases, such as GenBank, and the accession numbers will be included in the manuscript (Methods section) before it is finally accepted for publication. In addition, it is expected that any plasmids, transposons, viruses, microbial strains, or cell lines described for the first time in the paper will be made available to scientists for non-commercial purposes at reasonable cost following publication.

Preparation of manuscripts

1. Manuscripts should be written in English. Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by an English-speaking colleague prior to submission.

Language Editing: [Elsevier's Authors Home](#) provides details of some companies who can provide English language and copyediting services to authors who need assistance *before* they submit their article or *before* it is accepted for publication. Authors should contact these services directly. For more information about language editing services, please email authorsupport@elsevier.com.

Please note that Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our terms & conditions <http://www.elsevier.com/termsandconditions>.

2. Manuscripts should have **(numbered lines)** with wide margins and **double spacing** throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. **Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc. should be numbered.** However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

3. Manuscripts in general should be organized in the following order:

Title (should be clear, descriptive and not too long)

Name(s) of author(s)

Complete postal address(es) of affiliations

Full telephone, Fax No. and E-mail of the corresponding author

Present address(es) of author(s) if applicable

Complete correspondence address including e-mail address to which the proofs should be sent

Abstract

Keywords (indexing terms), normally 3 – 6 items. Please refer to the cumulative index.

Introduction

Material studied, area descriptions, methods, techniques

Results

Discussion

Conclusion

Acknowledgements and any additional information concerning research grants, etc.

References

Tables

Figure captions

Tables (separate file(s))

Figures (separate file(s))

4. Titles and subtitles should not be run within the text. They should be typed on a separate line, without indentation. Use lower-case letter type.

5. SI units should be used.

6. Elsevier reserves the privilege of returning to the author for revision accepted manuscripts and illustrations which are not in the proper form given in this guide.

Abstracts

Manuscripts of original research papers should include a structured Abstract of 250 or fewer words, organised under the sections: Problem addressed; Objective; Methods and approach; Results; Conclusions. Do not actually include section headings, but use this structure for the Abstract.

Tables

1. Authors should take notice of the limitations set by the size and lay-out of the journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions of a table.
2. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.
3. Tables should be numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.
4. Each table should occupy a separate page of the manuscript. Tables should never be included in the text.
5. Each table should have a brief and self-explanatory title.
6. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurement should be added between parentheses.
7. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.
8. Any explanation essential to the understanding of the table should be given as a footnote at the bottom of the table.

Illustrations

1. All illustrations (line drawings and photographs) should be submitted as separate files, preferably in TIFF or EPS format.
2. Illustrations should be numbered according to their sequence in the text. References should be made in the text to each illustration.
3. Illustrations should be designed with the format of the page of the journal in mind. Illustrations should be of such a size as to allow a reduction of 50%.
4. Lettering should be big enough to allow a reduction of 50% without becoming illegible, any lettering should be in English. Use the same kind of lettering throughout and follow the style of the journal.
5. If a scale should be given, use bar scales on all illustrations instead of numerical scales that must be changed with reduction.
6. Each illustration should have a caption. The captions to all illustrations should be typed on a separate sheet of the manuscript.
7. Explanations should be given in the figure legend(s). Drawn text in the illustrations should be kept to a minimum.
8. Photographs are only acceptable if they have good contrast and intensity.
9. If you submit usable colour figures, Elsevier would ensure that these figures appeared free-of-charge in colour in the electronic version of your accepted paper, regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. Colour illustrations can only be included in print if the additional cost of reproduction is contributed by the author: you would receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please note that because of technical complications which may arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version, should you not opt for colour in print), you should submit in addition usable black and white figures corresponding to all colour illustrations.
10. Advice on the preparation of illustrations can be found at the following URL: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

Preparation of supplementary data

Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

References

1. All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked ensure that the spelling of author's names and dates are exactly the same in the text as in the reference list. For original research papers, the list should not exceed 35 references (it may be longer for review articles).
2. In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed– if necessary – by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1988) has shown that..." "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1989, pp.12–16)".
3. If reference is made in the text to a publication written by more than two authors the name of the first author should be used followed by "et al.". This indication, however, should never be used in the list of references. In this list names of first author and co-authors should be mentioned.
4. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically on authors' names, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates –publications of the same author with one co-author – publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1974a, 1974b, etc.
5. Use the following system for arranging your references:
 - a. *For periodicals*
Chin, J.C., Dai, Y., Watts, J.E., 1995. Antibody response against *Pseudomonas aeruginosa* membrane proteins in experimentally infected sheep. *Vet. Microbiol.* 43, 21–32.
 - b. *For edited symposia, special issues, etc. published in a periodical*
Caffrey, J.P., 1994. Status of bovine tuberculosis eradication programmes in Europe. In: Wood, P.R., Monaghan, M.L., Rothel, J.S. (Eds.), *Bovine Tuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 40, 1–4.
 - c. *For books*
Armitage, P., Berry, G., 1987. *Statistical Methods in Medical Research*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 94–100, 411–416.
 - d. *For multi-author books*
Butler, J.E., 1981. A concept of humoral immunity among ruminants and an approach to its investigation. In: Butler, J.E., Nielson, K., Duncan, J.R. (Eds.), *The Ruminant Immune System*, Plenum Press, New York, pp. 3–55.
6. Abbreviate the titles of periodicals mentioned in the list of references; according to the *International List of Periodical Title Word Abbreviations*. The correct abbreviation for this journal is *Vet. Microbiol.*
7. In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained. However, the titles of publications in non-Latin alphabets should be transliterated, and a notation such as "(in Russian)" or "(in Greek, with English abstract)" should be added.
8. Work accepted for publication but not yet published should be referred to as "in press".
9. References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.
10. Web references may be given. As a minimum, the full URL is necessary. Any further information, such as Author names, dates, reference to a source publication and so on, should also be given.
11. Articles available online but without volume and page numbers may be referred to by means of their Digital Object identifier (DOI) code.

Formulae

1. Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used.
2. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.
3. Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.
4. The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Powers of e are often more conveniently denoted by exp.
5. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca²⁺, not as Ca⁺⁺.
6. Isotope numbers should precede the symbols, e.g. ¹⁸O.
7. The repeated writing of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P₂O₅).

Footnotes

1. Footnotes should only be used if absolutely essential. In most cases it should be possible to incorporate the information in normal text.
2. If used, they should be numbered in the text, indicated by superscript numbers, and kept as short as possible.

Nomenclature

1. Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*. Virologists should consult the latest Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses for proper nomenclature and spelling.
2. All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.
3. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.
4. For chemical nomenclature, the conventions of the *International Union of Pure and Applied Chemistry* and the official recommendations of the *IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature* should be followed.

Copyright

If excerpts from other copyrighted works are included, the Author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by Authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Oxford, UK: phone (+1) 215 239 3804 or +44(0)1865 843830, fax +44(0)1865 853333, e-mail healthpermissions@elsevier.com. Requests may also be completed online via the Elsevier homepage  <http://www.elsevier.com/permissions>.

Material in unpublished letters and manuscripts is also protected and must not be published unless permission has been obtained.

Authors Rights

As an author you (or your employer or institution) may do the following:

- make copies (print or electronic) of the article for your own personal use, including for your own classroom teaching use
- make copies and distribute such copies (including through e-mail) of the article to research colleagues, for the personal use by such colleagues (but not commercially or systematically, e.g., via an e-mail list or list server)
- post a pre-print version of the article on Internet websites including electronic pre-print servers, and to retain indefinitely such version on such servers or sites
- post a revised personal version of the final text of the article (to reflect changes made in the peer review and editing process) on your personal or institutional website or server, with a link to the journal homepage (on elsevier.com)
- present the article at a meeting or conference and to distribute copies of the article to the delegates attending such a meeting
- for your employer, if the article is a 'work for hire', made within the scope of your employment, your employer may use all or part of the information in the article for other intra-company use (e.g., training)
- retain patent and trademark rights and rights to any processes or procedure described in the article
- include the article in full or in part in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially)
- use the article or any part thereof in a printed compilation of your works, such as collected writings or lecture notes (subsequent to publication of your article in the journal)
- prepare other derivative works, to extend the article into book-length form, or to otherwise re-use portions or excerpts in other works, with full acknowledgement of its original publication in the journal

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors who publish in Elsevier journals to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit  <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post). Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

Author Services

Questions arising after acceptance of the manuscript, especially those relating to proofs, should be directed to Elsevier Ireland, Elsevier House, Brookvale Plaza, East Park, Shannon, Co. Clare, Ireland, Tel.: (+353) 61 709600, Fax: (+353) 61 709111/113.

Authors can also keep a track of the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track your accepted article" option on the journal's homepage <http://www.elsevier.com/locate/vetmic>. For privacy, information on each article is password-protected. The author should key in the "Our Reference" code (which is in the letter of acknowledgement sent by the Publisher on receipt of the accepted article) and the name of the corresponding author.

***Veterinary Microbiology* has no page charges**

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](#)