



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

***“Inquérito sorológico para leptospirose em cães da Ilha da Marambaia,
Rio de Janeiro, Brasil”***

por

Danielle Berniz de Oliveira

*Dissertação apresentada com vistas à obtenção do título de Mestre em Ciências
na área de Saúde Pública.*

*Orientadora principal: Prof.^a Dr.^a Martha Maria Pereira
Segunda orientadora: Prof.^a Dr.^a Joseli Maria da Rocha Nogueira*

Rio de Janeiro, julho de 2013.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

Esta dissertação, intitulada

“Inquérito sorológico para leptospirose em cães da Ilha da Marambaia, Rio de Janeiro, Brasil”

apresentada por

Danielle Berniz de Oliveira

foi avaliada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.^a Dr.^a Kátia Eliane Santos Avelar

Prof. Dr. Fabiano Borges Figueiredo

Prof.^a Dr.^a Martha Maria Pereira – Orientadora principal

Dissertação defendida e aprovada em 30 de julho de 2013.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos animais, que me inspiram à busca do conhecimento, para fazer o melhor pela saúde e bem estar daqueles que tanto amo e admiro. Dedico também à minha família, em especial ao meu marido Bruno Ferrari e à minha filha Alice.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por me dar saúde para trabalhar, serenidade nos dias mais difíceis, coragem para encarar os desafios e sabedoria nos momentos de decisão. Por me dar a dádiva da maternidade, que me ensinou tantas coisas a respeito da vida.

Ao meu marido Bruno, por me acompanhar desde a graduação, sempre me apoiando e incentivando, entendendo minhas ausências em momentos especiais das nossas vidas. Por inúmeras vezes não pude estar presente em seus trabalhos, entre estreias de peças e shows de samba e nos momentos mais difíceis, ele foi o meu divã, meu amigo e companheiro. Obrigada, minha vida, por estar sempre ao meu lado e por ter me proporcionado o melhor acontecimento de nossas vidas, que foi o nascimento da nossa filha Alice!

Não podia deixar de agradecer à minha “Gostosa”, “Bolotinha”, “Neném da mamãe”... à minha filha Alice, que chegou na minha vida no meado do mestrado, me ensinou a ter paciência e a acreditar em um futuro melhor para nós. Foi por você que não desisti. Pela certeza de que este título lhe servirá de exemplo futuro. “Te amo com toda liberdade, dentro da eternidade e a cada instante”. E será sempre por você que nunca desistirei!

À minha mãe Olivia, que em toda vida incentivou e dedicou-se aos meus estudos, abdicando muitas vezes do seu próprio bem estar para me dar apoio e orientação. Obrigada mãe, por cada conselho, força e energia positiva, por cuidar da Alice (a nossa “bolotinha”) aos domingos para que eu pudesse concluir este trabalho, te amo imensamente. Obrigada por me ensinar a ter fé!

À minha sogra Monique, que considero mãe, por me acolher como filha e se dedicar sempre ao meu bem estar e felicidade. Por torcer por mim a cada passo dado, a cada conquista, sempre apoiando e me convencendo a não desistir. Obrigada por achar que sou a melhor veterinária do mundo e por me fazer acreditar nisso (rsrs) e por cuidar tão bem e com tanto carinho da “Coisa linda da minha vó” (tha tha tha), para que eu pudesse estudar. As palavras que tenho a dizer não caberiam em um simples parágrafo de agradecimentos. Na semana final da entrega do trabalho, tirei suas férias, sua internet, seu computador, sua cama, seu sossego e ainda lhe dei uma dor de garganta (Alice só dorme no ar condicionado) e ainda assim você sempre com um sorriso e um “Bom dia, minha filha, tem café para você”. Obrigada, imensamente, minha mãe de alma!

Com a chegada da Alice, muitas mudanças ocorreram e veio a insegurança de deixá-la com estranhos ou creches. Então agradeço a “Diga” (Elaine), por ficar com ela nos dias de semana em que precisei trabalhar sair ou ficar escrevendo. Neste mesmo sentido, agradeço à tia avó Marlene, por cuidar da Alice como se fosse sua filha.

A todos meus amigos, em especial à Livia Lopes, que esteve sempre ao meu lado, desde a graduação, trabalhando nos meus plantões para eu estudar, escrever ou ir para FIOCRUZ. Obrigada por me ajudar na Marambaia, por torcer por mim, sempre me dando força e incentivando. Obrigada pelas “leituras dinâmicas” no meu trabalho, pelas dicas e pelos “puxões de orelha” nos momentos em que precisei. Deus não me deu um irmão de sangue, mas colocou você na minha vida. Uma “irmã” que tive o privilégio de escolher. A você, minha “irmã de alma”, o meu muito obrigada!

A todos meus familiares que sempre entenderam minha ausência nas reuniões e festas, em especial à minha prima e amiga Gisele Lessa, que esteve presente em todos os momentos da minha vida e acompanhando minha trajetória, sempre me incentivando e apoiando minhas decisões.

A minha orientadora Dra. Martha Maria Pereira, pelo apoio, incentivo e oportunidade de desenvolvimento deste trabalho em seu laboratório. Obrigada pelos ensinamentos, contribuindo como meu crescimento profissional e pessoal.

A minha segunda orientadora Dra. Joseli Nogueira, que me acolheu, incentivou e entendeu minhas ausências, sempre com um sorriso no rosto e uma voz serena, transmitindo seus conhecimentos e experiências com muita generosidade. Seus “puxões de orelha” e suas considerações foram de grande valia para aperfeiçoar meus conhecimentos e me fazer enxergar a realidade. Obrigada por se preocupar comigo e com o desfecho deste trabalho.

Aos professores em geral, que estiveram no meu caminho durante o mestrado, que com sabedoria e paciência me transmitiram conhecimentos e experiência, contribuindo na minha formação.

Aos meus colegas de turma Livia, Carla Verçosa, Amanda Codeço, Mônica Vieira, Morgana Camacho, Cristiane Costa, Edson Amarante e João Daniel. Quando entrei no mestrado não fazia a menor ideia de como seria. Com toda certeza vocês fizeram ser melhor. Obrigada a cada um pelo conhecimento transmitido através das experiências de vocês. Cada um na sua área de conhecimento contribuiu para meu crescimento pessoal e profissional.

À equipe técnica do Laboratório Nacional de Referência de Leptospirose (LNRL-CC/OMS), em especial aos técnicos Fernando e Mariana, que me ajudaram diretamente na realização das sorologias. À Dra. Ilana Balassiano, que participou da minha qualificação com sugestões imensamente válidas, contribuindo com seus conhecimentos para melhor organização e formulação do meu trabalho.

À equipe do Dr. Marcos Barbosa e Dr. Valmir Laurentino, que gentilmente cederam parte das amostras utilizadas no presente trabalho. Em especial ao técnico Adilson Almeida, que acompanhou a minha visita à ilha da Marambaia, me ajudando no conhecimento do local.

À equipe do Dr. Fabiano Figueiredo, que cedeu a outra parte das amostras utilizadas neste estudo. Mais uma vez, à Livia, que me ajudou na Marambaia e contribuiu com informações imensamente válidas para o meu trabalho.

A Secretaria Acadêmica (SECA) e a Coordenação de Pós-graduação, em especial ao Fábio Balbino, que me orientou nos procedimentos burocráticos com tanta gentileza e paciência.

A Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP) e ao Departamento de Ciências Biológicas (DCB).

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Foram tantas as pessoas que direta e indiretamente me acompanharam durante o mestrado, então peço desculpas àqueles que não foram citados. Tenham certeza que estão todos guardados com grande carinho em meu coração e memória!

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

Chico Xavier

Resumo

A leptospirose é uma zoonose endêmica de distribuição mundial causada por bactérias do gênero *Leptospira* com inúmeros sorovares distintos, dificultando sua caracterização. A maioria dos casos cursa com sinais e sintomas inespecíficos, sendo muitas vezes confundida com viroses. Exibe caráter sazonal em regiões tropicais em que há alta incidência de períodos chuvosos, afetando tanto a população urbana quanto a rural. No Brasil a doença tem grande importância social e econômica. Acomete além do homem, animais silvestres e domésticos, sendo os roedores sinantrópicos os principais reservatórios urbanos e o cão, potencial fonte de infecção para o homem. O presente estudo teve como objetivo realizar o primeiro inquérito sorológico para leptospirose em cães na Ilha da Marambaia, município de Mangaratiba, Rio de Janeiro, onde não há registro de casos em humanos nem em animais além da busca de casos humanos nos registros do SINAN e também avaliar as características ambientais da região. Possíveis casos de leptospirose canina foram investigados a partir de fichas clínicas com dados dos animais. Foram analisadas 234 amostras sanguíneas de cães coletadas em dois períodos: No decorrer dos anos de 2009 e 2012 em inquérito sobre leishmaniose visceral na ilha. A investigação foi realizada a partir da técnica de aglutinação microscópica (MAT), considerada internacionalmente como o, “padrão ouro” para o diagnóstico de leptospirose. O procedimento foi executado no Laboratório Nacional de Referência de Leptospirose (LNRL-CC/OMS), localizado no Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), no Rio de Janeiro. Do total de amostras estudadas, 2,56% (6/234) apresentaram reação positiva ao MAT para os sorovares Australis, Copenhageni e Patoc, com titulações que variaram de 80 a 640. O sorovar mais prevalente foi o Australis 66,66% (04/06), seguido pelo Copenhageni (01/06) e Patoc (01/06), ambos com a mesma frequência de 16,67%. Este foi um estudo preliminar na região e os dados indicam a possibilidade de circulação de *Leptospira* sp. embora não haja casos clínicos relatados. Os resultados encontrados podem indicar ainda possíveis reservatórios que devem ser confirmados em estudos posteriores. É importante frisar que além de detectarmos baixa incidência em cães, a região possui um ambiente propício para manutenção do micro-organismo. A precariedade do saneamento, a presença de animais silvestres, o movimento irrestrito de cães somados aos dados sorológicos encontrados sugerem a possibilidade de circulação de bactérias entre os cães e possíveis reservatórios no ambiente silvestre.

Palavras-chave: Leptospirose, cães, ilha, ciclo silvestre

Abstract

Leptospirosis is a zoonosis endemic worldwide distribution caused by bacteria of the genus *Leptospira* with numerous serovars distinct, complicating their characterization. Most cases presents with nonspecific signs and symptoms, and is often confused with viral diseases. Seasonal character displays in tropical regions where there is high incidence of rainy periods, affecting both the urban population and rural. In Brazil the disease has great economic and social importance. Affects besides man, wild and domestic animals. The sinantropic rodents are major urban reservoirs and dogs are a potential source of infection for man. The present study aimed perform the first serosurvey for leptospirosis in dogs on the Marambaia Island, municipality of Mangaratiba, Rio de Janeiro, where there are no reported cases in humans or in animals, beyond the pursuit of human cases in the records of SINAN. Possible cases of canine leptospirosis were investigated from clinical records with animal data. We analyzed blood samples from 234 dogs collected in two periods: During the years 2009 and 2012, in inquiry about visceral leishmaniasis on the island. The investigation was carried out from the microagglutination technique, regarded as by the Ministry of Health, "gold standard" for the diagnosis of leptospirosis. The procedure was performed at the National Reference Laboratory for Leptospirosis (LNRL-CC/OMS), located at the Oswaldo Cruz Institute (FIOCRUZ) in Rio de Janeiro. Of the total samples studied, 2.56% (6/234) showed a MAT positive reaction for serovars Australis, Copenhageni and Patoc with titrations ranging 80-640. The most prevalent serovar was Australis 66.66% (04/06), followed by Copenhageni (01/06) and Patoc (01/06), both with the same frequency of 16.67%. This was a preliminary study in the region and the data indicate the possibility of circulation of *Leptospira* sp. although no clinical cases reported. The results may also indicate possible reservoirs to be confirmed in further studies. Is importantly detach, that beyond detect low incidence in dogs, the region has an environment conducive to maintenance of the microorganism. The precarious sanitation, the presence of wild animals, the movement unrestricted of the dogs added to the serological data suggests that there is the possibility of circulation of bacteria between dogs and possible reservoirs in the sylvatic environment.

Keywords: Leptospirosis, dogs, island, sylvatic cycle

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 14 |
| 2 OBJETIVO GERAL | 15 |
| 3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 15 |
| 4 REVISÃO DE LITERATURA | 16 |
| 4.1 HISTÓRICO..... | 16 |
| 4.2 <i>Leptospira</i> spp..... | 17 |
| 4.2.1 Persistência no ambiente | 18 |
| 4.2.2 Classificação sorológica | 19 |
| 4.2.3 Classificação genotípica | 19 |
| 4.3 PATOGÊNESE..... | 20 |
| 4.4 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS | 21 |
| 4.5 IMPORTÂNCIA PARA SAÚDE PÚBLICA..... | 22 |
| 4.6 ASPECTOS CLÍNICOS DA LEPTOSPIROSE..... | 23 |
| 4.6.1 Leptospirose humana | 23 |
| 4.6.2 Leptospirose animal | 24 |
| 4.7 LEPTOSPIROSE CANINA..... | 26 |
| 4.7.1 Aspectos clínicos da leptospirose canina | 26 |
| 4.7.2 Métodos diagnóstico | 27 |
| 4.7.2.1 Hematologia e bioquímica..... | 28 |
| 4.7.2.2 Exame direto..... | 28 |
| 4.7.2.3 Cultura sanguínea..... | 29 |
| 4.7.2.4 Inoculação em animais de laboratório..... | 29 |
| 4.7.2.5 Ensaio imunoenzimático (ELISA)..... | 30 |
| 4.7.2.6 Reação em cadeia da polimerase (PCR)..... | 30 |
| 4.7.2.7 Histopatologia e imunohistoquímica..... | 30 |
| 4.7.2.8 Teste de aglutinação microscópica (MAT)..... | 30 |
| 4.7.3 Imunidade e imunização | 32 |
| 4.7.4 Tratamento | 33 |
| 4.7.5 Prevenção e controle | 33 |
| 4.7.6 Vigilância epidemiológica | 34 |
| 4.8 PARCERIA ENSP E A MARINHA DO BRASIL | 34 |

| | |
|---|----|
| 5 MATERIAL E MÉTODOS | 35 |
| 5.1 PROCEDIMENTO ÉTICO E PROVA LABORATORIAL..... | 37 |
| 5.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS..... | 38 |
| 5.1.1.1 Características geográficas e ambientais..... | 36 |
| 5.3 TESTE DE MICROALGUTINAÇÃO..... | 38 |
| 5.3.1 Triagem..... | 38 |
| 5.3.2 Titulação..... | 41 |
| 6 RESULTADOS | 42 |
| 6.1 ÁREA DE ESTUDO..... | 45 |
| 6.1.1 Visita á área de estudo..... | 45 |
| 6.2 BUSCA DE CASOS EM HUMANOS..... | 48 |
| 7 DISCUSSÃO | 50 |
| 8 CONCLUSÕES | 56 |
| 9 PERSPECTIVAS FUTURAS | 56 |
| REFERÊNCIAS | 57 |

Lista de Abreviaturas

| | |
|---------------------|--|
| ALT | Alanina Aminotransferase |
| CAPES | Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior |
| CAAT | Teste de Aglutinação Microscópica com Absorção Cruzada (<i>cross-agglutinin absorption test</i>) |
| CADIM | Centro de Adestramento da Ilha da Marambaia |
| CEUA | Comissão de Ética no Uso de Animais |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico |
| ELISA | Ensaio Imunoenzimático |
| EMJH | Meio de cultivo Ellinghausen |
| ENSP | Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca |
| FA | Fosfatase Alcalina |
| FIOCRUZ | Fundação Oswaldo Cruz |
| IOC | Instituto Oswaldo Cruz |
| IPEC | Instituto de Pesquisa Clínicas Evandro Chagas |
| MAT | Teste de Microaglutinação (<i>microscopic agglutination test</i>) |
| LNRL- CC/OMS | Laboratório Nacional de Referência de Leptospirose / Centro Colaborador da OMS |
| LPS | Lipopolissacarídeo |
| LAPCLIN- DERMZOO | Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos |
| PBS | Salina Tamponada com Fosfato |
| PCR | Reação em Cadeia da Polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>) |
| SINAN | Sistema de Informação de Agravos de Notificação |
| WHO | Organização Mundial de Saúde (<i>World Health Organization</i>) |

Lista de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1: Micrografia eletrônica de <i>Leptospira interrogans</i> | 17 |
| Figura 2: Esquema morfológico da <i>Leptospira interrogans</i> | 18 |
| Figura 3: Mapa da localização da Ilha da Marambaia, com destaques para os pontos de coleta..... | 35 |
| Figura 4 Foto da placa de microaglutinação..... | 39 |
| Figura 5: Foto da identificação das placas de microaglutinação..... | 39 |
| Figura 6: Foto da realização da técnica de microaglutinação..... | 39 |
| Figura 7: Foto da lâmina microscópica preparada para leitura do MAT..... | 39 |
| Figura 8: Ilustração das reações do MAT..... | 40 |
| Figura 9: Foto de residência em condições precárias de habitação..... | 45 |
| Figura 10: Foto de residência melhor estruturada..... | 46 |
| Figura 11: Foto de lixo próximo a beira da praia..... | 46 |
| Figura 12: Foto de Área de acúmulo de lixo no peridomicílio..... | 47 |
| Figura 13: Foto de esgoto doméstico lançado no peridomicílio..... | 47 |
| Figura 14: Mapa da Ilha da Marambaia com destaque para as praias onde foram encontradas amostras reagentes..... | 48 |

Lista de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Sorovares de <i>Leptospira</i> reagentes no MAT e seus títulos encontrados nas amostras referentes às coletas realizadas em 2009..... | 42 |
| Tabela 2: sorovares e respectivos títulos detectados nas amostras referentes às coletas realizadas em 2012..... | 43 |
| Tabela 3: Sorovares encontrados nos dois casos de coaglutinação..... | 44 |
| Tabela 4: Sorovares considerados reagentes nos anos de 2009 e 2012..... | 44 |

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma das zoonoses mais difundidas no mundo, causada por uma espiroqueta patogênica do gênero *Leptospira* e considerada um importante problema de saúde pública¹. Este gênero contém mais de 250 sorovares diferentes, que são antigenicamente distintos, o que torna difícil sua caracterização^{2, 3, 4}. O principal reservatório é constituído pelos roedores sinantrópicos que albergam leptospiras nos rins, eliminando-as vivas no meio ambiente, contaminando água, solo e alimentos. O *R. norvegicus* é o principal portador do sorovar *Icterohaemorrhagiae*, um dos mais patogênicos para o homem. Outros reservatórios são suínos, bovinos, equinos, ovinos, caprinos e os cães⁵. Os surtos da doença ocorrem por exposição à água contaminada com urina ou tecidos provenientes de animais infectados, principalmente em regiões com altos índices pluviométricos⁶.

A primeira fase da doença em humanos é caracterizada por febre abrupta acompanhada de mialgia, cefaleia, que frequentemente não são diferenciadas de outras doenças febris agudas⁷. Tem grande importância social e econômica devido à sua alta incidência, percentual significativo das internações, alto custo hospitalar e perdas de dias de trabalho, como também por sua letalidade. Em relação aos animais, a leptospirose também representa um grande problema econômico produzindo abortos, natimortos, infertilidade, déficit de crescimento, produção de leite reduzida e morte⁸.

Inúmeros são os casos humanos notificados por ano em todas as grandes metrópoles do mundo. Com a ocorrência de grandes epidemias urbanas na América Latina a ocorrência de surtos de leptospirose após enchentes não é um fenômeno novo e nem restrito a regiões tropicais⁹. Apesar do elevado número de notificação da doença, a Sociedade Internacional de Leptospirose acredita que haja subnotificação dos casos, principalmente pela dificuldade em diferenciar este agravo de outras doenças febris agudas, o que leva a não confirmação diagnóstica dos casos reais¹⁰. O desconhecimento da verdadeira situação da leptospirose no Brasil resulta em falhas nas medidas preventivas e de controle da doença.

As informações disponibilizadas nas bases de dados a respeito da ocorrência de leptospirose em Mangaratiba e regiões ao seu redor ainda são defasadas, não existindo estudos ou notificações a respeito da ocorrência deste agravo na Ilha da Marambaia. Além disto, a presença de cães no local é um fator relevante para investigação, visto que estes podem albergar leptospiras vivas e elimina-las no ambiente. Outra questão a se considerar é o fato da área ser uma reserva ecológica e sua fauna não é totalmente conhecida, o que deixa

uma falha na construção da cadeia epidemiológica da doença neste local, existindo a possibilidade da ocorrência de um ciclo silvestre na localidade.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar a soroprevalência para Leptospirose em cães na Ilha da Marambaia, município de Mangaratiba, Rio de Janeiro.

3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Avaliar as características geográficas e ambientais da ilha em relação ao risco de Leptospirose em especial para a população de cães;
- 2- Avaliar a presença de sorovares de *Leptospira* spp. na ilha da Marambaia
- 3- Investigar possíveis relatos de casos em humanos notificados na região.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 HISTÓRICO

A leptospirose é uma doença que exhibe caráter zoonótico e é bastante difundida no mundo. O agente responsável pelo agravo é uma bactéria patogênica do gênero *Leptospira*, considerada um importante problema de saúde pública¹. Foi descrita pela primeira vez em 1880 no Cairo, por Larrey e provavelmente introduzida na Europa pelo *Rattus norvegicus* no século XVIII. Weil, em 1886 descreveu a doença, ao observar casos em humanos, porém foi Goldschmidt em 1887, que designou a síndrome clínica, como a conhecida “Doença de Weil”¹¹. No entanto, outras citações, aparentemente sobre a mesma doença, já haviam sido descritas alguns anos antes. Landouzy em 1883 descreveu a patologia analisando certos sintomas em funcionários da limpeza de esgotos em Paris, mas foi Stimson, em 1907 que demonstrou através da impregnação pela prata a presença de espiroquetas nos túbulos renais de um paciente falecido, supostamente de febre amarela. Como as espiroquetas apresentavam as extremidades em forma de gancho ele as denominou de *Spirochaeta interrogans*.

Em 1910 após uma epidemia da doença de Weil, Hecker e Otto, com o objetivo de identificar o micro-organismo causador da síndrome, injetaram sangue de um paciente doente em vários animais, mas somente um macaco ficou doente com sintomas atípicos⁸. Com o mesmo objetivo, Inada e Ido inocularam sangue de um paciente humano doente, em cobaias e comprovaram ser a espiroqueta o agente causador da doença, as quais deram o nome de *Spirochaeta icterohaemorrhagiae*. Estudos realizados em meados de 1915 na Alemanha por Ulenhuth e Frommer detectaram as espiroquetas no sangue de porcos após inoculação dos mesmos com sangue de soldados com sintomas característicos da “Doença de Weil”. Em 1917, Noguchi criou o gênero *Leptospira* e neste mesmo ano Ido e colaboradores identificaram o papel do rato como fonte de infecção da doença⁹.

No Brasil, a leptospirose foi reconhecida pela primeira vez no Pará, por McDowel em 1917. No mesmo ano, Aragão verificou a presença de *Leptospira icterohaemorrhagiae* ao estudar seis *Rattus norvegicus* da cidade do Rio de Janeiro. O interesse pela leptospirose canina iniciou com Dacorso Filho, em 1940, que analisou através de necropsia, 11 cães que foram a óbito e apresentavam manifestações clínicas sugestivas de leptospirose, demonstrando a presença do agente causador. A partir daí inúmeros estudos foram realizados

por diversos autores. Santa Rosa e colaboradores em 1970 publicaram sua experiência, após nove anos de estudo, em que analisaram soros humanos, bovinos, suínos, equinos, ovinos, caninos, caprinos e bubalinos encontrando frequência maior para o sorovar Icteroahemorrhagiae em humanos, Pomona em suínos e Wolffii em bovinos. Alguns anos antes, Magaldi estudou a incidência e a prevalência da distribuição da leptospirose no Brasil, alertando para a suscetibilidade do país a proliferação do agravo^{12, 13, 14}. No ano de 2010, foram notificados 1.025 casos da doença no estado do Rio de Janeiro, sendo 284 confirmados. Nesse período, 55 municípios também fizeram notificações, sendo o Rio de Janeiro o de maior frequência de confirmações. Nos meses em que há maior índice pluviométrico, a vigilância da doença deve ser redobrada, visto que há maiores chances de ocorrência de enchentes, sendo indispensável o incentivo dos serviços de vigilância integrada voltados à suspeita clínica, diagnóstico diferencial e tratamento oportuno de casos, além de notificação, investigação e análise periódica dos dados para que se faça o direcionamento adequado e a priorização de ações para o controle da doença¹⁵.

4.2 *Leptospira* spp.

O agente etiológico da leptospirose pertence ao filo Spirochaete, ordem *Spirochaetales* da família *Leptospiraceae*¹⁶. O nome deste filo faz referência ao formato helicoidal que estas bactérias apresentam. As leptospiros possuem dimensão de 0,1 a 0,25 μ m de espessura e 6 a 20 μ m de comprimento. São espiroquetas móveis, em forma espiral longa, finas e flexíveis, que possuem gancho característico na porção terminal, em uma ou ambas as extremidades (figura 1)⁸.

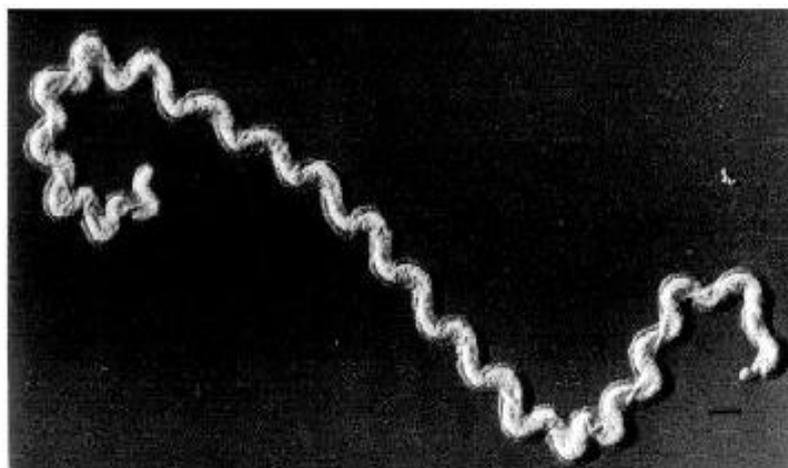


Figura 1: Micrografia eletrônica de *Leptospira interrogans*⁸.

A parede externa da célula bacteriana é composta por uma membrana coberta por flagelos periplasmáticos que compõem o filamento axial ou endoflagelo, o qual permite movimentos de saca-rolhas (spin) e de flexão-extensão facilitando a mobilidade bacteriana no ambiente (figura 2)¹⁷. São aeróbias obrigatórias, que apresentam crescimento fastidioso *in vitro* nos meios de Fletcher ou Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH), com pH de 6,8-7,4 e temperatura entre 28 e 30°C¹⁸.

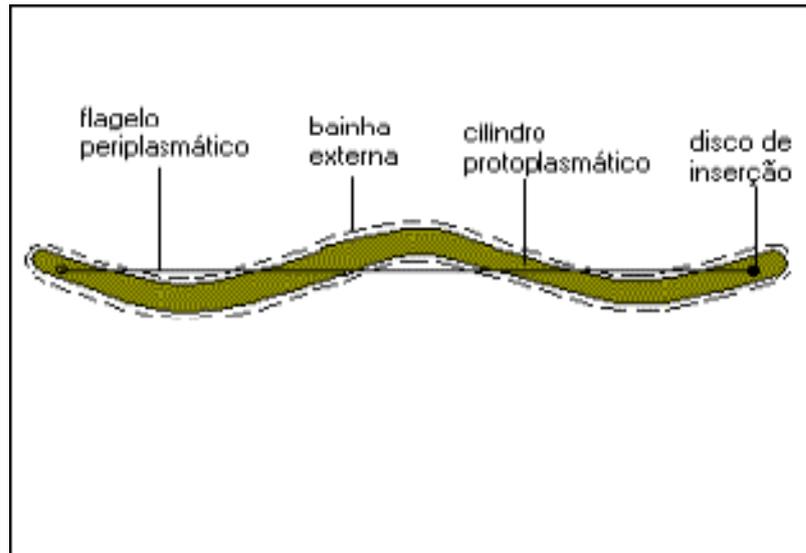


Figura 2: Esquema morfológico da *Leptospira interrogans*¹⁷

O isolamento e classificação de cepas patogênicas de *Leptospira* spp. são processos demorados, decorrentes principalmente da baixa taxa de crescimento, muitas vezes aliado à contaminação concomitante com microrganismos de crescimento mais rápido, e rigorosas exigências da cultura *in vitro* desta bactéria¹⁸. A persistência dos focos de leptospirose ocorre, principalmente devido ao elevado grau de variação antigênica do agente, a ampla variedade de animais suscetíveis e a sua capacidade de sobrevivência no ambiente de aproximadamente 180 dias¹⁹.

4.2.1 Persistência no ambiente

A persistência de leptospiros no ambiente, em ausência de parasitismo, é favorecida pela presença de umidade e de um pH neutro ou levemente alcalino, preferencialmente em torno de 7,2 a 7,4^{8, 9}. As bactérias são rapidamente destruídas pela desidratação, possuindo sensibilidade à luz solar direta, às variações de pH (abaixo de 6,0 e acima de 8,0), aos desinfetantes comuns e à temperaturas entre 50 e 60°C^{20, 21}. Entretanto, temperaturas abaixo

de zero são toleradas em ambientes contendo proteína, sobrevivendo à criopreservação, pelo menos por três anos, em nitrogênio líquido⁸.

4.2.2 Classificação sorológica

Desde 1915 até 1989, a classificação era apenas sorológica. O gênero *Leptospira* era inicialmente dividido em dois grupos: *Leptospira interrogans* e *Leptospira biflexa*. Estes dois grupos também diferiam nas suas exigências nutricionais e outras propriedades fenotípicas. A *Leptospira interrogans*, compreendia todas as cepas patogênicas e *Leptospira biflexa*, compreendia as cepas saprófitas isoladas do ambiente^{9,22}.

O gênero *Leptospira* contém vários sorovares, que são antigenicamente distintos devido a mudanças na composição do lipopolissacarídeo (LPS) subdividindo o grupo em aproximadamente 260 sorovares, o que torna difícil sua caracterização. Por conveniência, os sorovares relacionados antigenicamente foram organizados em sorogrupos, sendo descritos aproximadamente 24 sorogrupos para cepas patogênicas^{2, 3, 4, 18, 20, 23, 24}. A Sorotipagem é determinada pelo teste de aglutinação microscópica com absorção cruzada (*cross-agglutinin absorption test* - CAAT), no qual são utilizados soros imunes de referência produzidos em coelhos²⁵. Por décadas, CAAT foi usado para a classificação de *Leptospira*, no entanto, esta técnica é complicada e demorada para tipagem de rotina, em grande parte devido ao tempo necessário para a preparação de soro imune de coelho. Outro método é o teste de microaglutinação MAT (*microscopic agglutination test*) usando anticorpos monoclonais específicos²⁶.

Este tipo de classificação é importante para a epidemiologia, uma vez que eles apresentam relações diretas com alguns animais reservatórios, focos de infecção e distribuição geográfica²². A medida que cada sorotipo é geralmente associado a um hospedeiro particular, a identificação de sorotipos é essencial para estudos epidemiológicos e no desenvolvimento de estratégias de prevenção apropriadas⁸.

4.2.3 Classificação genotípica

A heterogeneidade genética entre as espécies *L. interrogans* e *L. biflexa* foi demonstrada por Yasuda e colaboradores em 1987. Estudos de hibridização de DNA definiram 16

genomoespécies de *Leptospira*. Estas, não correspondem às espécies anteriores (*L. biflexa* e *L. interrogans*), com isso nem sorovar e nem sorogrupo predizem espécies de *Leptospira*⁹. Mais recentemente, o sistema genotípico tem agrupado as leptospiras em 20 espécies, definidas com base na hibridização DNA-DNA²². Dentre as espécies descritas há, pelo menos, quatro genomoespécies que ainda não foram nomeadas, sendo estas alocadas em quatro grupos²⁷.

O Grupo 1- *L. borgpetersenii*, *L. broomii*, *L. fainei*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. licerasiae*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. weilii*, *L. wolffii*, *L. kirschneri* e *L. kmetyi* que possuem sorovares patogênicos.

Grupo 2- *L. meyeri* possui sorovares saprófitas e sorovares patogênicos.

Grupo 3- *L. alexanderi* possui sorovares saprófitas e outros desconhecidos.

Grupo 4- *L. biflexa* e *L. wolbachii* contem cepas saprófitas

A reclassificação taxonômica das leptospiras, por genotipagem fornece bom fundamento para uma nova classificação¹⁴.

4.3 PATOGÊNESE

As portas de entrada para estas delgadas bactérias são as mucosas oral, nasal, conjuntival e genital, além de pele e tecidos lesados. Também podem penetrar ativamente através da pele íntegra após imersão em água contaminada por tempo prolongado, permitindo a dilatação dos poros^{28, 29}. As bactérias são fagocitadas por macrófagos na presença de anticorpos específicos. As cepas virulentas associam-se aos neutrófilos, mas não são destruídas. A fagocitose ocorre apenas na presença de soro e complemento, sugerindo que o envelope exterior da bactéria tenha um componente antifagocítico. O LPS anti-leptospira estimula a adesão dos neutrófilos às células endoteliais além de causar agregação plaquetária, sugerindo um papel importante no desenvolvimento de trombocitopenia⁹. Dependendo da resistência do hospedeiro e a produção de anticorpos circulantes, as leptospiras deixam a corrente circulatória e passam a persistir nos órgãos e tecidos do sistema imune, sendo a localização renal a mais importante do ponto de vista epidemiológico, pois a urina passa a ser a principal via de eliminação da bactéria²⁹.

4.4 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

O principal reservatório é constituído pelos roedores das espécies *Rattus norvegicus* (ratazana ou rato de esgoto), *Rattus rattus* (rato de telhado ou rato preto) e *Mus musculus* (camundongo ou catita). Estes animais albergam leptospiros nos rins, eliminando-as vivas no meio ambiente e contaminando água, solo e alimentos. O *R. norvegicus* é o principal portador do sorovar *Icterohaemorrhagiae*, um dos mais patogênicos para o homem⁷.

Estes animais vivem em qualquer ambiente terrestre que lhes dê condições de sobrevivência e apresentam excelente adaptação ecológica, tolerando os climas mais extremos. Suportam grandes altitudes e podem mostrar inúmeras adaptações fisiológicas. Algumas espécies são consideradas sinantrópicas por associarem-se ao homem em virtude de terem seus ambientes modificados pela própria ação antrópica e são separadas em comensais (aqueles que dependem unicamente do ambiente do homem) e não comensais ou silvestres (ainda não inteiramente dependentes do ambiente antrópico). Neste último, há formação de colônias no ambiente silvestre, afastado do contato com o homem, no entanto as transformações ambientais, decorrentes dos processos de urbanização associados às mudanças de ecossistemas naturais permite que esta divisão em comensais e não comensais, não seja permanente. Algumas espécies já apresentam populações com elevado grau de sinantropia³⁰.

Além da proximidade dos roedores ao ambiente humano, os riscos de infecção aumentam devido à capacidade da bactéria poder sobreviver em ambiente úmido por um longo período³¹. Locais arborizados e sombreados, alta umidade, higienização precária, circulação de animais sinantrópicos, foram relatados por Machado e colaboradores³² como fatores associados a maior predisposição à infecção por leptospiros em mamíferos, bem como o contato direto com a fonte de infecção.

Outros reservatórios são suínos, bovinos, equinos, ovinos, caprinos e os cães¹⁹. Levantamentos sorológicos têm demonstrado o envolvimento de diferentes espécies sinantrópicas e silvestres na epidemiologia da doença. Dentre as espécies citadas, destacam-se os cães, como importante elo na transmissão da doença ao homem, pois podem manter a bactéria por período prolongado nos rins, podendo eliminá-la na urina sem apresentar sinais clínicos ou após obter melhora clínica. Esse fato se torna mais agravante devido aos hábitos domésticos desses animais e sua estreita relação com os humanos^{33, 34}.

4.5 IMPORTÂNCIA PARA SAÚDE PÚBLICA

A leptospirose é uma enfermidade de notificação compulsória em todo o Brasil. Quando há casos suspeitos, deve-se realizar a notificação à vigilância epidemiológica municipal para inclusão no Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN)^{35, 19}. Possui grande importância social e econômica devido à sua alta incidência e percentual significativo das internações, alto custo hospitalar e perdas de dias de trabalho, como também por sua letalidade⁹. Nos países com clima temperado, os grupos de maiores riscos estão entre os agricultores, fazendeiros, tratadores de animais, veterinários, profissionais que tenham contato com animais e militares³⁶.

Barcellos e Sabroza³⁷, analisando o contexto ambiental de um surto de leptospirose em 1996 na zona oeste do Rio de Janeiro, verificaram que as maiores taxas de incidência ocorreram nas regiões sujeitas à inundação e ao redor das zonas de acumulação de lixo, apontando para a combinação de fatores sociais e ambientais. Reis e colaboradores³⁸ encontraram a prevalência de 15,4% em uma localidade de baixa condição de vida na cidade de Salvador, sendo observada elevada prevalência entre adolescentes e adultos.

As condições de pobreza favorecem a prevalência das chamadas “negligenciadas”, que permanecem não somente nestas condições, mas também contribuem para a manutenção do quadro de desigualdades. Este termo tem sido utilizado para se referir a um conjunto de doenças causadas por agentes infecciosos e parasitários que ocorrem de maneira endêmica em populações de baixa renda e esta denominação tomou como base o fato de que por um lado tais doenças não despertam o interesse comercial para as grandes empresas farmacêuticas multinacionais e por outro os seus estudos vem sendo pouco financiado pelas agências de fomento³⁹. A leptospirose é uma patologia que não consta na lista das doenças negligenciadas, no entanto Hotez e colaboradores⁴⁰ afirmam que uma lista expandida poderia facilmente incluí-la, além de algumas outras doenças que ocorrem de forma cíclica e endêmica.

A distribuição temporal da leptospirose entre os anos de 1995 e 1999 mostra a ocorrência de uma grande epidemia, alguns dias após o Município do Rio de Janeiro ter sido assolado por fortes tempestades no mês de fevereiro de 1996⁴¹. No Brasil, entre os anos 2000 e 2011, foram confirmados 44.447 casos. Em 2000 foram 3.487 e em 2011 este número chegou a 4.684. Do total de confirmações, o maior número foi observado na região Sudeste, com 15.850 casos registrados no período⁴².

Em relação aos animais domésticos, o cão é um elemento importante na transmissão da doença tanto para o homem, devido à sua proximidade, quanto para outros animais. Em

estudo realizado por Freire e colaboradores⁴³ foram analisadas 120 amostras de soro sanguíneo de cães com clínica sugestiva de leptospirose no período de março a novembro de 2004. Para o diagnóstico, foi utilizada a técnica sorológica de microaglutinação, considerada “padrão ouro” pelo Ministério da Saúde. Das amostras estudadas, 88 (73,3%) obtiveram positividade na sorologia. Verificou-se amplo predomínio para o sorvar *Icterohaemorrhagiae*, com 60 amostras reativas (50%), seguido de *Copenhageni*, com 19 amostras reativas (15,8%) e *Canicola*, com nove amostras reativas (7,5%).

Para Bharti e colaboradores⁴⁴ o conhecimento da prevalência dos sorovares bem como os hospedeiros mantenedores em cada região é de extrema importância para se entender a epidemiologia da doença, visto que a manutenção e prevalência de sorovares distintos dentro de uma população dependem dos reservatórios animais e dos sorovares que eles albergam.

4.6 ASPECTOS CLÍNICOS DA LEPTOSPIROSE

4.6.1 Leptospirose Humana

A leptospirose humana possui apresentações clínicas variáveis compreendendo as formas assintomáticas, subclínicas e quadros clínicos graves. Para melhor compreensão, as formas clínicas da leptospirose são divididas em fase precoce ou de leptospiremia e fase tardia ou fase imune¹⁹.

A fase precoce da doença se manifesta com início súbito de febre, cefaleia, mialgia, anorexia, náuseas e vômitos. Podem ocorrer diarreia, artralgia, hiperemia, tosse seca, fotofobia, dor ocular e hemorragia conjuntival. Esta fase tende a ser autolimitada e regride em três a sete dias, sem deixar sequelas. Costuma ser diagnosticada como uma “síndrome gripal”, “virose” ou outras doenças que ocorrem na mesma época, como dengue ou influenza. Geralmente, a leptospirose é associada a intensas dores musculares, principalmente em região lombar e nas panturrilhas. No entanto, nenhum desses sinais clínicos é suficientemente sensível ou específico para diferenciar a leptospirose de outras doenças febris agudas¹¹.

A manifestação clássica da leptospirose grave é a síndrome de Weil, que se caracteriza por icterícia, insuficiência renal aguda e hemorragias. Entretanto, essas manifestações podem se apresentar concomitantemente ou isoladamente na fase tardia da doença. A síndrome de hemorragia pulmonar onde ocorre lesão pulmonar aguda sangramento pulmonar maciço tem

sido reconhecida, cada vez mais, como uma manifestação importante na fase tardia da doença⁵.

4.6.2 Leptospirose Animal

A leptospirose representa um grande problema econômico produzindo abortos, natimortos, infertilidade, déficit de crescimento, produção de leite reduzida e morte de animais, como vacas, porcos, ovelhas, cabras, cavalos e cães⁸.

Nos equinos a apresentação clínica habitual é de uma febre ligeira, acompanhada de anorexia. Nas formas mais graves, derrame conjuntival, petéquias em mucosas, hemoglobinúria, anemia, icterícia, depressão e fraqueza. Em éguas prenhes pode ocorrer abortamento e os potros recém-natos, infectados no útero, podem mostrar sinais clínicos graves e morrer⁸. Um diferencial em equinos é o aparecimento de complicações oculares após a fase de latência da doença. A presença de *Leptospira* no interior do globo ocular causa uveíte progressiva, podendo resultar em cegueira²⁰. Os sorovares frequentemente encontrados nesta espécie em diversos estados brasileiros são Icterohaemorrhagiae, Pyrogenes, Hardjo, Pomona, Patoc, Castellonis, Autumnalis e Grippytyphosa⁴⁵.

Bovinos infectados podem apresentar infertilidade, mastites, abortos, retenção da placenta, alterações congênitas, natimortalidade e variedade de bezerros prematuros. Dependendo da variedade de sorovares infectantes, alguns bezerros podem apresentar anemia hemolítica, congestão pulmonar, meningite, leve icterícia, rins aumentados de volume, diminuição da ruminação, hemoglobinúria e óbito. Esta doença causa grandes prejuízos econômicos devido ao aumento do intervalo entre partos e à diminuição da produção de leite e de carne consumíveis²⁰. Os inquéritos sorológicos realizados em populações bovinas, no território brasileiro, evidenciam como importantes os sorovares Hardjo, Wolffii, Pomona, Grippytyphosa, Icterohaemorrhagiae e Canicola, sendo mais prevalente o sorovar Hardjo^{46, 47, 48}.

Em suínos jovens ocorre a leptospirose aguda, com hipertermia, perda de apetite, olhos vermelhos, icterícia e convulsões. Leitões recém-nascidos podem desenvolver hemorragias, hematúria, icterícia e sinais de insuficiência renal, podendo levar à morte. Natimortos, abortamentos, nascimento de leitões fracos ou doentes, são muitas vezes os primeiros e os únicos sinais da leptospirose. Mas normalmente a infecção nesta espécie é subclínica, ocorrendo excreção da bactéria pela urina por longos períodos de tempo, tornando os suínos

uma fonte de infecção para outras espécies que são mais gravemente afetadas⁸. Os sorovares frequentemente encontrados nos suínos são Pomona, Icterohaemorrhagiae, Tarassovi, Canicola, Gryppotyphosa, Bratislava e Muenchen⁴⁹.

Nos ovinos a doença tem importância social e econômica regional, pois se tratam de animais de produção, em especial nas regiões sul e nordeste do Brasil. A localização renal das leptospiros e sua multiplicação colocam em risco a sanidade do rebanho e a saúde humana, pela possibilidade de contaminação ambiental através da urina infectada⁹. No quadro agudo o animal apresenta anorexia, febre, hemoglobinúria, diarreia, anemia, icterícia, sinais nervosos e aborto; e no crônico leptospirúria por meses²⁰. Carvalho e colaboradores⁵⁰ encontraram os sorovares Autumnalis, Castellonis, Grippotyphosa, Pyrogenes, Butembo e Pomona em ovinos no estado do Piauí.

Em relação aos gatos, os relatos são raros e os sinais clínicos em geral são brandos ou inaparentes, mesmo que haja leptospiremia e leptospirúria, inflamações renais e hepáticas^{49, 51}. Um estudo realizado por Larsson e colaboradores⁵² constatou que nenhuns dos dez gatos inoculados com sorovares Icterohaemorrhagiae e Canicola apresentaram sinais clínicos compatíveis com a doença, no entanto 90% deles apresentaram aglutininas anti-*Leptospira*, sendo possível detectá-las na urina por até 12 semanas após a inoculação.

Tratando-se de animais silvestres, a leptospirose ainda é pouco estudada na fauna brasileira o que gera uma lacuna no estudo da cadeia epidemiológica da leptospirose, dificultando a elaboração de planos estratégicos para o controle da doença em regiões com vasta densidade de animais, matas e rios⁵³. O melhor conhecimento da leptospirose na fauna silvestre é de grande importância para o controle e profilaxia da enfermidade nas espécies doméstica e humana⁵⁴.

No Brasil, os sorovares Canicola, Pyrogenes, Grippotyphosa, Pomona, Ballum, Australis, Mangus, Wolffii, Swajizak, Brasiliensis, Guaratuba, Gaucurus e Goiano foram isolados de animais silvestres^{55, 56}. Milagres⁵⁷ encontrou soropositividade em amostras de soros de capivara nos estados de Minas Gerais e São Paulo para os sorovares Andarmana, Australis, Copenhageni, Hardjo e Icterohaemorrhagiae. Machado e colaboradores³² encontraram soropositividade em diversas espécies, pertencentes ao zoológico municipal de Uberaba, MG.

4.7 LEPTOSPIROSE CANINA

No Brasil existem diversas linhas de pesquisa focadas na investigação de casos de leptospirose canina com o intuito de estimar sua ocorrência e distinguir os sorovares mais frequentes em diferentes regiões, sendo considerada uma doença endêmica no país e o cão um elemento importante na transmissão da enfermidade para diversas espécies, incluindo o homem^{4, 58}. Esta importância só não se destaca à dos roedores, devido a estes serem portadores assintomáticos e reservatórios naturais da doença que, histórica e epidemiologicamente, sempre assumiram posição de destaque como fonte de infecção para os humanos e outros animais⁵⁹.

A Secretaria Municipal de Saúde de São Paulo disponibiliza uma publicação denominada Manual do Educador que classifica os cães de comunidade da seguinte maneira⁶⁰:

Cães de proprietários e supervisionados: São aqueles animais inteiramente domiciliados.

Cães de família ou semidomiciliados: Aqueles que dependem do proprietário para alimentação e abrigo, porém não têm restrição de movimentação, têm acesso às ruas.

Cães de vizinhança: Animais que a comunidade se encarrega de alimentar e cuidar, mas não possuem um responsável por eles. Vivem soltos e se abrigam em qualquer lugar.

Cães errantes ou ferais: Os animais que compõem esta classificação vivem praticamente sem contato com humanos, são independentes e sem controle.

Esta classificação permite identificar os animais denominados de “família e vizinhança”, como aqueles que oferecem maior risco de transmissão de zoonoses. Segundo Magalhães e colaboradores⁶¹ este grupo de animais possuem 3,59 vezes maior risco de se infectarem com *Leptospira*.

4.7.1 Aspectos clínicos da leptospirose canina

A leptospirose no cão pode ser manifestada de formas variadas podendo ser hiperaguda, aguda, subaguda, crônica e assintomática⁴⁹. Os animais que sobrevivem à fase aguda da doença podem se tornar portadores assintomáticos e eliminar leptospiras no ambiente através da urina⁶². Na fase de leptospiremia, o fígado é um dos primeiros locais a ser atingido,

acarretando necrose dos hepatócitos, colestase intrahepática com conseqüente diminuição da excreção da bilirrubina^{8, 63}. O cão pode manifestar alterações sistêmicas da enfermidade: febre, depressão, anorexia, vômito, dores musculares, dor renal, meningite, desidratação e congestão de membranas mucosas, em alguns animais ocorrem também colapso vascular e morte superaguda⁶⁴. Segundo Acha e Szyfres⁵¹ a infecção pode variar desde uma forma assintomática até quadros clínicos mais graves, sendo a hemorrágica, a forma mais grave da doença. Ela instala-se repentinamente em três a quatro dias com sinais de febre seguida por rigidez e mialgias dos membros posteriores, hemorragias na cavidade bucal podendo levar a necrose e faringite, seguidas posteriormente de hemorragias gastrointestinais, nefrite aguda e icterícia.

A icterícia ocorre principalmente devido à lesão hepática, concomitantemente, os rins começam a ter problemas de filtração levando a um quadro de uremia onde o animal apresenta hálito de amônia. Este é o quadro agudo da doença no homem e no cão com duração de quatro a sete dias²⁸. As manifestações pulmonares, como a pneumonia intersticial, são menos frequentes em cães do que em seres humanos, sendo acompanhadas de respiração difícil e tosse¹⁴.

Segundo Acha e Szyfres⁵¹ os sorovares predominantes nos cães são Canicola e Icterohaemorrhagiae. Melo e Manhoso⁵⁸ em uma revisão sobre os aspectos epidemiológicos da leptospirose canina no Brasil, notaram uma predominância do sorovar Canicola, seguido pelo Copenhageni, Icterohaemorrhagiae e Autumnalis.

A infecção do cão por outros sorovares está na dependência da existência do portador natural nas proximidades, em quantidade suficiente para contaminar o meio ambiente. Por exemplo, cães que adquirem a infecção pelo sorovar Grippotyphosa são geralmente os cães de caça ou que residem em áreas suburbanas, onde podem ser encontrados roedores e outros mamíferos silvestres⁶⁵.

4.7.2 Métodos diagnósticos

O diagnóstico clínico da leptospirose requer a confiança decorrente de experiências, apoiada por confirmação laboratorial. Os sintomas não são patognomônicos, logo o ambiente epidemiológico, história clínica, sintomas e achados no exame físico podem permitir um diagnóstico clínico, no entanto faz-se necessária a associação das características clínico-epidemiológicas e laboratoriais para a confirmação. Existem diversos métodos laboratoriais

para o diagnóstico da leptospirose, tais como: Os Testes simples de macroaglutinação e o imunoenzimático- ELISA IgM. O teste sorológico de microaglutinação e a reação em cadeia da polimerase (PCR) também são recomendados para diagnóstico e investigação epidemiológica. Para esclarecimento etiológico de óbitos deve-se realizar os testes histopatológicos além da pesquisa de leptospiros por colorações especiais ou imunohistoquímica (cérebro, pulmão, rim, fígado, pâncreas e coração)^{8, 9, 19}.

O método laboratorial de escolha depende da fase evolutiva em que se encontra o paciente. Na fase aguda, durante o período febril, as leptospiros podem ser visualizadas no sangue através de exame direto ou a partir de cultura em meios apropriados ou de inoculação em animais de laboratório⁶⁶. A maioria dos laboratórios veterinários oferece somente o teste de aglutinação microscópica e alguns tentam a cultura bacteriana. As técnicas de ELISA, anticorpos fluorescentes, PCR, ou isolamento das leptospiros das amostras biológicas, podem ser feitas em laboratórios de referência. O diagnóstico diferencial em cães inclui a erlichiose, riquetsioses, hepatite canina e anemia hemolítica autoimune⁴⁹.

4.7.2.1 Hematologia e bioquímica.

O diagnóstico da leptospirose em cães necessita de exames laboratoriais complementares, associados às manifestações clínicas sugestivas, como vômito, diarreia, anorexia, mucosas ou conjuntivas amareladas, sensibilidade abdominal ou lombar. Na hematologia durante a fase inicial da doença, quando há leptospiremia, pode-se encontrar leucopenia que evolui para leucocitose com neutrofilia e desvio à esquerda com a progressão da doença, além da possibilidade de haver variados graus de anemia. Nos cães em estado grave pode haver trombocitopenia. Exames bioquímicos revelam frequentemente aumento dos níveis séricos de ureia e creatinina, que variam de acordo com o grau de lesão renal. As alterações das enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA), assim como os níveis séricos de bilirrubina, variam com a gravidade da lesão hepática. A urinálise revela geralmente densidade baixa, glicosúria, proteinúria e bilirrubinúria⁶⁷.

4.7.2.2 Exame direto

As espiroquetas podem ser visualizadas por diversas técnicas microscópicas. A pesquisa pode ser realizada através da microscopia em campo escuro, microscopia comum em campo

claro corada pelo vermelho do Congo, através da impregnação pela prata, também conhecido como o método de Fontana-Tribondeau e ainda por microscopia de fluorescência¹¹. Estes exames podem ser realizados a partir de amostras de urina, sangue, sêmen e líquidos resultantes do conteúdo gástrico de fetos abortados⁶⁸.

4.7.2.3 Cultura sanguínea

O período ideal para realização da hemocultura é na fase aguda da doença, preferencialmente até o 7º dia do início dos sintomas. É um método demorado, somente verificando amostras positivas após algumas semanas, o que proporciona sempre diagnóstico retrospectivo⁸. Além disto, esta fase tende a ser auto limitada e regride em três a sete dias, sem deixar sequelas e não é incomum ser diagnosticada como uma “virose” ou outras doenças que ocorram na mesma época, como dengue¹⁹.

Nos cães, pode-se realizar a cultura a partir de sangue, líquido e urina⁶⁷, sendo recomendado o uso de meios seletivos de Fletcher ou de Ellinghausen (EMJH) enriquecido com antimicrobianos e soro-albumina bovina²⁰.

Vários fatores estão relacionados à baixa sensibilidade das hemoculturas, entre eles, a interferência de anticorpos específicos presentes no sangue, a dificuldade de crescimento “in vitro” do micro-organismo, mesmo em meios enriquecidos e o uso precoce e indiscriminado de antibióticos⁶⁹. No entanto, o isolamento da bactéria indica o diagnóstico definitivo da infecção e proporciona estudos epidemiológicos e profiláticos da leptospirose nas regiões acometidas⁷⁰.

4.7.2.4 Inoculação em animais de laboratório

Em relação ao diagnóstico clínico, este método não é vantajoso quando comparado com os outros existentes. No entanto pode ser utilizado para manutenção, em laboratório, de cepas que não se adaptam muito bem aos meios de cultura. Para isso geralmente utilizam os cobaias e os hamsters⁷¹.

4.7.2.5 Ensaio Imunoenzimático (ELISA-IgM)

Neste método, é utilizado soro sanguíneo do paciente. Nele, é possível detectar anticorpos a partir da primeira semana da doença até um ou dois meses após. O período ideal para coleta é durante a fase aguda. Caso o teste indique um resultado negativo, indica-se repetição do mesmo em cinco a sete dias¹⁹. Com este método é possível distinguir anticorpos da classe IgM e IgG. Na fase aguda, os cães apresentam títulos elevados de IgM (maior que 1:320)⁷².

Este teste tem sido considerado bastante sensível, porém inclui desvantagens como a falta de especificidade, a relação entre níveis de anticorpos e estado imune do animal⁷³.

4.7.2.6 Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

Esta técnica ainda tem sido utilizada de maneira restrita à área de pesquisa e a laboratórios de referência. O diagnóstico é possível nos estágios iniciais da doença sendo possível obtenção do DNA bacteriano em quaisquer fluidos biológicos, dispensando a necessidade da presença de anticorpos⁷⁴.

O método em questão é um meio eficaz de diagnóstico antes do desenvolvimento do título do anticorpo ou quando os títulos estão baixos e o curso clínico confuso⁷².

4.7.2.7 Histopatologia e Imunohistoquímica

É um meio diagnóstico mais empregado após o óbito de pacientes suspeitos. Neste caso são coletadas amostras de diversos órgãos, incluindo cérebro, fígado, rins, pâncreas, pulmão, coração e músculo esquelético, recomenda-se musculatura da panturrilha. Para Levett órgãos como rins, fígado, coração e pulmões são melhores visualizados pela histopatologia⁹.

4.7.2.8 Teste de aglutinação microscópica (MAT)

Esta técnica é realizada a partir de antígenos vivos e considerada pelo Ministério da Saúde (MS) como o exame laboratorial “padrão ouro” para a confirmação do diagnóstico da leptospirose, pois além de detectar anticorpos específicos, classifica os sorovares isolados.

As leptospiras vivas crescidas no meio líquido são expostas à diluição em série do soro do paciente. O anticorpo no soro do paciente causa aglutinação do organismo. O título relatado contra um sorovar em particular reflete a diluição de soro mais alta que causará a aglutinação de 50% do sorovar⁷⁵. Pacientes normalmente produzem anticorpos aglutinantes contra o sorovar infectante, entretanto muitas vezes é observada reação cruzada com outros sorovares, isto é particularmente visível no início do curso da infecção²⁶.

A associação de constatações clínicas, histórico e exames laboratoriais compatíveis com o quadro da doença em pacientes cuja sorologia revela um título alto são suficientes para concluir o diagnóstico. A reação cruzada contra sorovares diversos, geralmente resulta em títulos elevados para vários sorovares durante a fase aguda da doença⁶³. O sorovar que anula o título mais alto é normalmente considerado o agente infectante; títulos mais baixos são atribuídos à reação cruzada⁴. Os títulos de aglutinação microscópica podem ser negativos durante a primeira semana de infecção⁴⁹.

Apesar de não existir obrigatoriamente uma relação entre título sorológico e infecção, nos cães, tradicionalmente considera-se suspeito quando o título for igual ou superior a 200, embora diluições com títulos positivos de 100 sejam suficientes para confirmar diagnóstico⁷⁶. Muitos autores contestam esta ideia, aceitando diferentes valores de título como 200, 400 e 800²⁶. Alguns cães desenvolvem elevados títulos (aproximadamente 3200) após a vacinação, que vai declinando com o passar do tempo, podendo persistir por até seis meses após a imunização⁴, logo, é imprescindível a anamnese a respeito do histórico vacinal contra leptospirose, pois os cães vacinados podem apresentar títulos para sorovares contidos na vacina. Dados como o uso precoce de antibiótico ou administração de corticosteroides são importantes, pois podem inibir títulos convalescentes⁶⁷.

Vários aspectos do teste de microaglutinação são importantes na execução de um diagnóstico apurado. A reação cruzada contra sorovares múltiplos frequentemente resulta no título aumentado contra vários sorovares durante a fase aguda da doença⁶³. Recomenda-se testar o soro suspeito com um maior número de antígenos possíveis, dentre os que representam os principais sorovares comuns na região de ocorrência de casos da doença para que possam ser detectados sorovares pouco comuns ou não detectados até então⁷⁷.

4.7.3 Imunidade e imunização

A imunidade em relação à leptospirose é principalmente, humoral, envolvendo a opsonização de leptospiras por fagócitos como macrófagos e neutrófilos⁷⁸, podendo ser transmitida através da placenta, do colostro e do soro⁸. No entanto, Marinho e colaboradores⁷⁹, afirmam que a resposta imune celular é consideravelmente importante, devido à atividade dos macrófagos e à produção de citocinas, para conter o processo infeccioso. A resposta humoral é demonstrada por testes sorológicos com uma maior atividade de anticorpos da classe IgG e IgM, após infecção natural ou imunização⁸⁰. Um mesmo indivíduo pode apresentar a doença mais de uma vez, se o agente causal de cada infecção pertencer a um sorovar distinto do anterior, pois a imunidade adquirida pós-contágio é sorovar específica⁵.

Ainda não existe no Brasil vacina humana disponível para leptospirose⁵. Para uso humano, Cuba e China desenvolveram vacinas que mostraram eficácia de 78% e 75%, respectivamente, prevenindo a manifestação clínica da doença por um período de um ano. Estas vacinas não conferem imunidade cruzada e não apresentam imunidade duradoura, são específicas para os sorogrupos que as compõem^{5,81}.

As vacinas contra leptospirose disponíveis no mercado para animais domésticos são as chamadas bacterinas, que conferem imunidade pouco duradoura, cerca de seis meses⁸² e são sorovar específicas, com isso faz-se necessária a repetição semestral da vacina para que a imunidade seja mantida, no entanto Klaasen e colaboradores⁸³ afirmaram que os cães imunizados apresentam-se reagentes com resposta duradoura de um ano frente a desafios pós-vacinais. Além da questão da duração da resposta imunológica, as vacinas são produzidas com um sorovar ou associações restritas de sorovares, o que limita a proteção dos animais, já que existem cerca de 250 sorovares distintos⁸⁴. Em geral, as vacinas comerciais para cães incluem geralmente os sorovares Canicola e Icterohaemorrhagiae⁴⁹.

A imunização de animais domésticos é eficaz em reduzir a prevalência e a gravidade da leptospirose canina, evitando que adoeçam pelos sorovares componentes da vacina, mas não evita o estado carreador e nem que se infectem com outros sorovares. Levando em consideração a estreita relação do homem com o cão em nossa sociedade e com o intuito de prevenir danos causados por esta doença, a imunização ainda é a forma mais contundente de se evitar a infecção humana frente à facilidade de contato direto ou indireto com o animal infectado^{9,49}.

O levantamento da ocorrência de diferentes sorovares como Pomona, Hardjo, Grippotyphosa e Bratislava em cães, traduz a importância da pesquisa continuada para o desenvolvimento de novas vacinas contra leptospirose canina com inclusão de novos sorovares²⁰.

4.7.4 Tratamento

A eficácia da terapia da leptospirose em cães depende do diagnóstico precoce da doença e o tratamento de suporte depende da gravidade da infecção, da presença de disfunção renal ou hepática e de outros fatores agravantes. A antibioticoterapia é necessária e a droga de escolha para o tratamento é a penicilina na dose de 21.000 a 64.000 UI, a cada oito ou doze horas por via intravenosa ou intramuscular⁴⁹. Algumas quinolonas são eficazes e podem ser usadas em combinação com penicilina na fase aguda da doença. A administração de doxiciclina por via oral, na dose 2,5 a 5,0 mg/Kg a cada 12 horas durante duas semanas, seguindo-se a terapia com penicilina, é indicada para eliminar a fase de portador renal⁸⁵.

4.7.5 Prevenção e controle

Para o controle e a prevenção da leptospirose recomenda-se assistência médica adequada do paciente enfermo além de confirmação, notificação e investigação epidemiológica de casos, possibilitando a detecção de áreas de risco, permitindo ações de controle. Alertar a população, para que evite entrar em áreas alagadas sem proteção individual, nos períodos que antecedem a chuva. Controle de roedores (anti-ratização e desratização) e melhoria das condições higiênico-sanitárias da população. Proteção e desinfecção de áreas contaminadas pela urina destes animais e medidas que tornem o ambiente impróprio à instalação e proliferação de roedores. Manter higiene dos cães e de locais de criação animal, retirando sobras alimentares destes animais, pois servem de atrativos a roedores. Segregação e tratamento de animais domésticos infectados e/ou doentes além de imunização de animais domésticos⁸⁶.

4.7.5 Vigilância epidemiológica

A vigilância epidemiológica tem como objetivos orientar e adotar medidas de prevenção da doença, em particular, antes dos períodos das grandes chuvas, em áreas de ocorrência cíclica. Também reduzir a letalidade da doença, mediante a garantia de diagnóstico e tratamento precoce e adequado. Monitorar a ocorrência de casos e surtos e determinar a sua distribuição espacial e temporal e identificar os sorovares circulantes em cada área além de direcionar as medidas preventivas e de controle destinadas à população, ao meio ambiente e aos reservatórios animais^{7, 86}.

A leptospirose é um problema de saúde pública global e ainda é severamente negligenciada tendo sua carga global em grande parte desconhecida. Estima-se em meio milhão os casos humanos graves por ano sendo, provavelmente, esta incidência subestimada e a carga para saúde animal é ainda desconhecida¹⁰.

4.8 PARCERIA DA ENSP E A MARINHA DO BRASIL

A Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP) e a Marinha do Brasil assinaram um termo de compromisso com o intuito de desenvolver projetos e atividades, no campo do ensino e pesquisa em ciência e tecnologia e informação técnico-científica. Estes projetos têm por objetivo avaliar a prevalência de vetores e o risco de transmissão de agravos como a leishmaniose, malária e arboviroses. Também busca a ocorrência de doenças sexualmente transmissíveis, enteroparasitos em amostras de fezes, solo e água. A parceria também tem interesse em estudos fitoquímicos e biológicos de plantas da restinga, além de promover ações de educação para saúde nas comunidades residentes e efetivos militares da região⁸⁷. Pondo em prática esta parceria, pesquisadores da Fiocruz desenvolvem diferentes projetos na ilha, entre eles encontra-se a investigação de leishmaniose visceral em cães iniciado em 2009. Esses estudos favorecem, de forma positiva, novas pesquisas na área, pois já possibilitaram a realização de um censo da população canina da região no ano de 2012, sendo contados 116 cães⁸⁸.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Para o presente estudo foram utilizadas 234 amostras de soro sanguíneo coletadas de cães na ilha da Marambaia, no decorrer dos anos de 2009 (121/234) e 2012 (113/234), por pesquisadores da Fiocruz em investigação para leishmaniose visceral nestes animais, tratando-se, portanto de uma amostra de conveniência. Estes materiais foram estocados no Laboratório Nacional de Referência de Leptospirose (LNRL-CC/OMS), localizado no Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ) no município do Rio de Janeiro, tendo sido as coletas realizadas nas seguintes praias da Ilha da Marambaia: Sito, João Manoel, Caju, Suja, Grande, Cutuca, José, Caetana, Pescaria Velha e uma área de mata conhecida como Buraco Quente (figura 3).



Figura 3: Mapa da Ilha da Marambaia¹: Em destaque os pontos onde foram realizadas as coletas: **A**: praia do Sítio; **B**: praia João Manoel; **C**: Praia do Caju; **D**: praia Suja; **E**: Buraco Quente; **F**: praia Grande; **G**: praia do Cutuca; **H**: praia do José; **I**: praia da Caetana; **J**: Pescaria Velha

¹ Figura disponível no Google Earth acessado e editado em 15 de maio de 2013.

A ilha da Marambaia está situada no litoral sul do estado do Rio de Janeiro e possui 42 km², que se liga ao continente por uma faixa de areia de cerca de 40 km de extensão (figura 3)⁸⁹. Apresenta relevo variado desde planícies arenosas ao nível do mar, até a floresta ombrófila densa, atingindo o pico da Marambaia com 641m. A região possui uma parcela representativa da Mata Pluvial Costeira, possuindo relevo variado, com matas de baixada e de encosta, incluindo formações típicas de restingas e manguezais⁹⁰. Além de ser uma área militar, também é um paraíso ecológico com rica fauna e flora, sendo considerada área de proteção ambiental (APA), de vital importância para o meio ambiente⁹¹.

As ilhas costeiras, em grande número na costa sul do Estado do Rio de Janeiro estão localizadas entre os municípios de Mangaratiba e Paraty e representam fontes importantes de informação biológica, especialmente em relação à conservação da biodiversidade em áreas fragmentadas⁹². A palavra Marambaia é originária da língua tupi-guarani, e significa “cerco do mar”, nome dado pelos primeiros habitantes da região à baía que é conhecida como Baía de Sepetiba⁹³. O limite geográfico da Ilha encontra-se entre o litoral da Barra de Guaratiba, no município do Rio de Janeiro e o distrito de Itacuruçá, no município de Mangaratiba, estando ligada ao continente através da Restinga da Marambaia.

O acesso à ilha é restrito e controlado pela Marinha do Brasil, onde mantém ali o Centro de Adestramento da Ilha da Marambaia (CADIM), sendo o mesmo permitido aos convidados das Forças Armadas e moradores locais. Segundo censo anual realizado pela Marinha do Brasil existe 352 habitantes, distribuídos em 103 famílias^{II}. A população civil da ilha recebe assistência médico-ambulatorial fornecida pela Marinha, com intervenção dos médicos e enfermeiros do CADIM. Além de prestar este serviço, mantém embarcações e lanchas rápidas para transporte de pacientes em estado grave. As Secretarias Municipal e Estadual de Saúde, do município de Mangaratiba dispõem das instalações hospitalares do Centro de Adestramento para auxiliar no controle de zoonoses e realizar atendimento médico preventivo aos moradores civis da ilha, através de programas de vacinação contra gripe para idosos, vacinação para crianças, programa de saúde familiar (PSF), fiscalização e controle de vetores⁹⁴.

As chuvas são comuns na região, permitindo um excedente hídrico em todos os meses do ano. Entre novembro e março ocorrem as maiores precipitações e os meses mais secos vão de junho a setembro. As temperaturas médias mensais variam ao longo do ano com amplitude

^{II} Dados fornecidos pela Marinha do Brasil.

máxima de 6 °C, sendo a média do mês mais frio de 19 °C, em junho e do mês mais quente de 25 °C, em fevereiro⁹⁰.

Nas proximidades das residências, existem cultivos de subsistência, tais como bananeiras, cana, mandioca e frutíferas. Nas instalações da Marinha, residem militares e seus familiares, além de uma população flutuante de militares, professores e prestadores de serviços que chegam pela manhã e retornam ao continente no final do expediente⁹³.

Encontra-se na ilha animais domésticos, principalmente cães, equinos e aves na região de ocupação humana. Também observa-se animais silvestres como primatas, capivaras, pequenos mamíferos, répteis e anfíbios⁹⁵. O conhecimento básico da diversidade encontrada nessas áreas é ainda incipiente, muitas vezes não havendo sequer uma lista de espécies⁹⁶.

5.1 PROCEDIMENTO ÉTICO E PROVA LABORATORIAL

O procedimento foi aprovado pelo comitê de ética no uso de animais (CEUA) sob licença: LW- 82/2010-1^{III}.

A prova laboratorial de escolha para realização do inquérito foi a técnica de aglutinação microscópica descrita por Galton e colaboradores⁹⁷ e Cole e colaboradores⁹⁸, com uma coleção de antígenos vivos que incluem os seguintes sorovares: Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Canicola, Grippotyphosa, Pomona, Australis, Bataviae, Castellonis, Cynopteri, Javanica, Panamá, Pyrogenes, Hardjo, Sejroe, Patoc, Tarassovi, Autumnalis, Hebdomadis e Wolffi, pertencentes ao painel de antígenos de referência recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para o diagnóstico sorológico da leptospirose na região estudada, foi realizada no LNRL-CC/OMS.

^{III} Em 2009 os soros foram coletados por Alonso, cuja tese de doutorado ainda não foi publicada. Em 2012 as coletas foram realizadas por Carmo⁸⁸⁸⁸.

5.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras sanguíneas coletadas em 2009 estavam estocadas no Laboratório de Imunodiagnóstico no Departamento de Ciências Biológicas (DCB/Fiocruz). Os soros obtidos em 2012, foram transportadas até o Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos (LAPCLIN-DERMZOO), acondicionadas em caixa térmica contendo placas de gelo em gel mantendo os soros refrigerados. O soro foi separado por centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos, e através de uma pipeta estéril descartável o soro separado foi transferido para microtubos tipo *ependorf* e conservado a - 20°C no LAPCLIN-DERMZOO. Todas as amostras foram transportadas ao LNRL-CC/OMS nas mesmas condições até o momento da realização do teste sorológico.

5.3 PROCEDIMENTO DA TÉCNICA DE MICROAGLUTINAÇÃO

Seguindo as recomendações de Basil¹¹, a diluição inicial do soro seria na proporção 1:50 [0,1ml (100µl) se soro e 4,9ml de PBS estéril]. No entanto optou-se por uma nova diluição que totalizou 200µl [0,04 ml (40µl) do soro e 0,16 ml (160µl) de PBS estéril], devido ao baixo volume de algumas amostras, que não permitiria a diluição recomendada. Este volume foi o máximo, que pôde ser adotado para realização do MAT sem que houvesse perda de material estudado.

Após este procedimento, foi realizada a filtração dos soros diluídos, utilizando-se um filtro com porosidade de 0,45µm (para a retenção de qualquer tipo de sólido em suspensão, que possa interferir na leitura ao microscópio). Feito isto, os soros diluídos foram acondicionados em tubos de ensaio.

5.3.1 Triagem

A triagem consiste da análise da reação das cepas de *Leptospira* sp. com os possíveis anticorpos da classe IgG presentes no soro do paciente.

Foram utilizadas placas de microaglutinação (96 poços, com fundo chato e tampa) identificadas em sua lateral com o número da amostra (Figuras 04 e 05).

Com um pipetador automático foram pipetados 50 μ L de cada amostra diluída em 19 orifícios da placa (número de antígenos presentes na bateria). Em seguida foram pipetadas 50 μ l das suspensões antigênicas correspondentes obtendo-se uma diluição final de 1:10 (Figura 06).

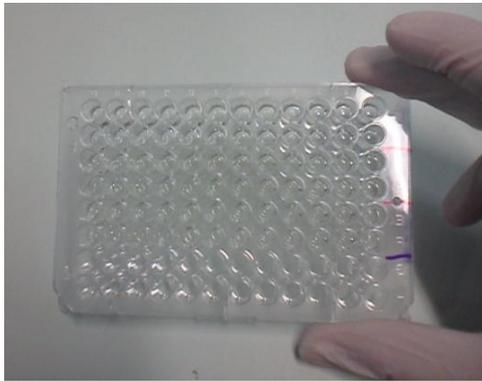


Figura 04: Placa de microaglutinação (foto Berniz, 2011)

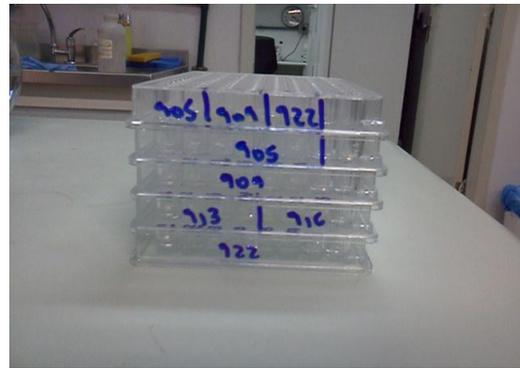


Figura 05: Identificação lateral das placas de microaglutinação (foto: Berniz, 2011).

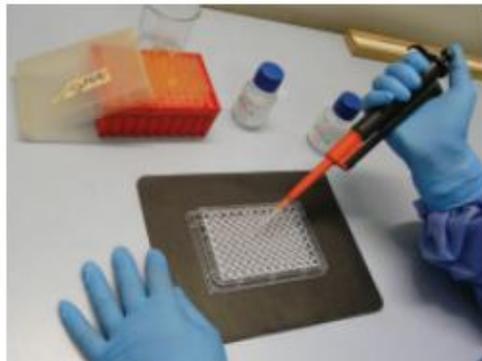


Figura 06: Microdiluição⁹⁹.

Após duas horas de incubação que tem por objetivo a ocorrência da reação antígeno-anticorpo, e com auxílio de uma pipeta automática, colocou-se uma gota de cada poço, dispostas em fileiras sobre lâmina microscópica (Figura 07), sem utilização de lamínula, em microscópio com condensador de campo escuro com objetiva de 10X e observou-se a ocorrência ou não de aglutinação.

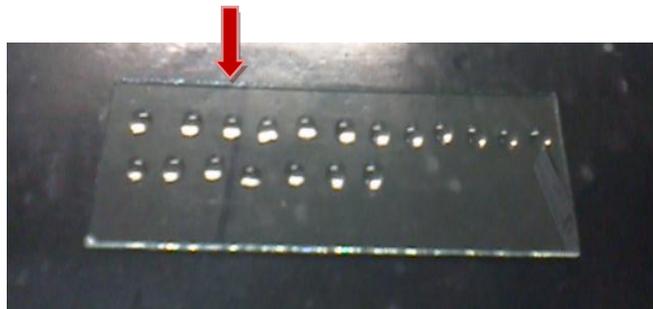


Figura 07: Lâmina microscópica contendo gotas da mistura antígeno-anticorpo, dispostas em fileiras (Foto: Berniz, 2011).

A figura 07 mostra uma lâmina com dezenove gotas (número de antígenos estudados no presente trabalho) da mistura do soro com o antígeno testado, depositadas sobre lâmina, em ausência de lamínula. Cada gota (indicada pela seta) é um antígeno diferente, reagindo com o mesmo soro testado.

O critério para avaliação da aglutinação foi estabelecido como 1, 2, 3 ou 4 cruces, correspondentes a 25, 50, 75 e 100% de leptospiras aglutinadas, respectivamente. O grau de aglutinação é determinado, considerando-se a quantidade de leptospiras livres no campo microscópico e a quantidade aglutinada. Foram consideradas reações positivas àquelas em que apresentaram 50% ou mais de antígenos aglutinados em relação ao controle (figura 08). As amostras positivas foram tituladas para verificação dos títulos de anticorpos aos sorovares reagentes.

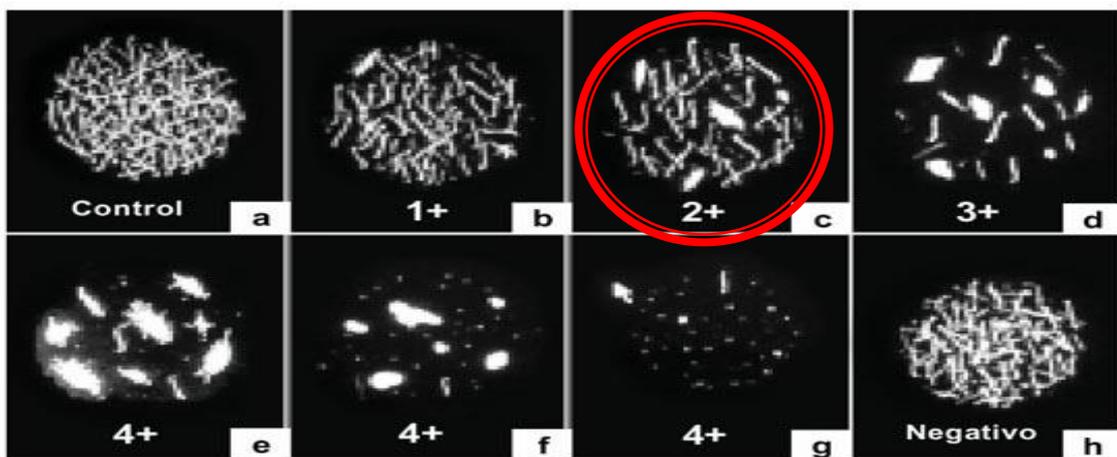


Figura 08: Reações do teste de aglutinação microscópica (MAT) **a:** lâmina controle; **b:** lâmina com 25% de aglutinação; **c:** lâmina com 50% de aglutinação; **d:** lâmina com 75% de aglutinação; **e:** lâmina com 100% de aglutinação; **f:** lâmina com 100% de aglutinação e lises; **g:** lâmina com 100% de lise; **h:** lâmina negativa^{IV}.

A figura 08 é adaptada de uma publicação do autor Céspedes¹⁰⁰ que indica as reações do teste de aglutinação microscópica onde observam-se lâminas sem aglutinação (a e h) e outras com graus variados de aglutinação, sendo considerado positivas aquelas que apresentaram 50% ou mais de aglutinação (Figura 08 - **imagem c** - indicada pelo círculo vermelho).

^{IV} Figura adaptada de Céspedes¹⁰⁰.

5.3.2 Titulação

A titulação tem como base a diluição dos anticorpos presentes no soro, e sua reação com o antígeno. Os soros reagentes são testados quantitativamente contra os antígenos com os quais reagiram. Considera-se como título, a diluição máxima do soro que foi capaz de aglutinar cerca de 50% das leptospiras.

Seguindo os critérios estabelecidos por nós no laboratório, a partir da diluição inicial foram preparadas diluições consecutivas e ao dobro, nas placas de microaglutinação, correspondendo à titulação de um determinado sorovar. Foram pipetados 50µl de PBS estéril no primeiro poço (orifício de controle do antígeno reagente na triagem). No segundo orifício da placa foi colocado 100µl do soro diluído (20µl do soro e 80µl de PBS estéril), na proporção 1:5. Do terceiro ao décimo segundo poço foram pipetados 50µl de PBS estéril. Com auxílio de pipetador automático, foi retirado 50µl do segundo orifício e adicionado aos 50µl de salina do terceiro poço, obtendo-se diluições em séries e ao dobro, até a o último poço, desprezando 50µl finais.

Após duas horas de incubação, procedeu-se a leitura, como descrito na etapa de triagem. Foi considerado como título, a maior diluição do soro capaz de aglutinar 50% ou mais das leptospiras em relação ao controle. O cut-off (ponto de corte) estabelecido foi 80.

Casos de leptospirose humana foram pesquisados a partir da coleta de dados oficiais junto aos registros do SINAN, no estado do Rio de Janeiro e no município de Mangaratiba, além da investigação na Ilha da Marambaia. Neste último as informações obtidas foram cedidas pela equipe médica da Marinha do Brasil na região do estudo (ver resultados). A busca de informações de possíveis casos em cães foi realizada através da avaliação de uma ficha clínica apresentada no momento da coleta do sangue, com questionamentos como idade, estado físico geral, escore corporal, coloração de mucosas, imunização e local de residência. A análise ambiental foi feita com base em dados geográficos e ambientais disponíveis na literatura (Carmo⁸⁸; Conde⁹⁰; Marinha do Brasil⁹⁴; Mattos¹³³; Silveira⁹⁵).

6 RESULTADOS

Dos 234 soros de canídeos analisados 06 (2,56%) foram sororreagentes na prova de microaglutinação. Os sorovares que reagiram com os soros caninos encontrados foram: Australis, Copenhageni, Pomona, Patoc e Hebdomadis. As tabelas 1 e 2 mostram os resultados do MAT com as amostras referentes aos anos de 2009 e 2012, respectivamente e os seus títulos.

Tabela 1: Sorovares de *Leptospira* reagentes no MAT e seus títulos encontrados nas amostras referentes às coletas realizadas em 2009.

| Sorovar | Título | | | | Frequência absoluta | Frequência relativa (%) |
|--------------|----------|----------|----------|----------|---------------------|-------------------------|
| | 80 | 160 | 320 | 640 | | |
| Australis | 1 | - | - | - | 1 | 33,33 |
| Copenhageni | - | 1 | - | - | 1 | 33,33 |
| Patoc | 1 | - | - | - | 1 | 33,33 |
| Total | 2 | 1 | - | - | 3 | 100 |

Nas amostras referentes ao ano de 2009, foram detectadas reações para três sorovares distintos: Australis, Copenhageni e Patoc, que apresentaram a mesma frequência de reações, não ocorrendo casos de coaglutinação, ou seja, os três animais sororreagentes apresentaram anticorpos anti-leptospira para sorovares diferentes. Os títulos referentes às reações foram: 160 para o sorovar Copenhageni e 80 para os sorovares Australis e Patoc.

Em relação às amostras do ano de 2012, foram encontrados os sorovares Australis, Copenhageni, Hebdomadis e Pomona. Os títulos por sorovar são apresentados na tabela-2.

Tabela 2: Sorovares e respectivos títulos detectados nas amostras referentes às coletas realizadas em 2012.

| Sorovar | Título | | | Frequência absoluta | Frequência relativa (%) |
|--------------|----------|----------|----------|---------------------|-------------------------|
| | 160 | 320 | 640 | | |
| Australis | 1 | - | 2 | 3 | 42,85 |
| Copenhageni | 2 | - | - | 2 | 28,57 |
| Hebdomadis | - | 1 | - | 1 | 14,29 |
| Pomona | - | 1 | - | 1 | 14,29 |
| Total | 3 | 2 | 2 | 7 | 100 |

Três animais foram reagentes a quatro sorovares distintos em 2012. Os títulos referentes às reações foram: 160 para os sorovares Australis e Copenhageni, 320 para os sorovares Hebdomadis e Pomona e 640 para o sorovar Australis.

No ano de 2009, os pesquisadores que estavam investigando leishmaniose visceral canina na ilha, inseriram um chip de identificação em alguns animais. Nesta mesma época um grupo da prefeitura municipal de Mangaratiba realizou o mesmo procedimento em outros cães, gerando um viés na identificação dos animais. Devido a problemas na leitura dos chips, foi possível correlacionar os resultados encontrados de apenas um animal nos anos distintos.

A amostra de um mesmo animal, que em 2009 apresentou anticorpos para o sorovar Copenhageni com título de 160, em 2012 apresentou a mesma titulação para o mesmo sorovar. No entanto, na amostra mais recente, este cão também apresentou aglutininas anti-leptospira para os sorovares Australis, Hebdomadis e Pomona, sendo seus respectivos títulos: 160, 320 e 320.

Considerando a soropositividade acima citada, foi possível observar a ocorrência de dois casos de coaglutinação, onde há reação para mais de um sorovar na mesma amostra. Uma delas reagiu para quatro sorovares distintos e a outra para dois, ambas pertencentes ao ano de 2012. A tabela 3 indica os sorovares encontrados nos dois casos de coaglutinação.

Tabela 3: Sorovares encontrados nos dois casos de coaglutinação.

| Sorovar | Título | | |
|-------------|--------|-----|-----|
| | 160 | 320 | 640 |
| Australis | - | - | a/b |
| Copenhageni | a/b | - | - |
| Hebdomadis | - | a | - |
| Pomona | - | a | - |

*a e b são as duas amostras que apresentaram aglutininas anti-leptospira para mais de um sorovar.

A amostra (a) reagiu contra os sorovares Australis, Copenhageni, Hebdomadis e Pomona, com títulos 640, 160, 320 e 320, respectivamente. Já a amostra (b) obteve reação para os sorovares Australis e Copenhageni sendo seus respectivos títulos 640 e 160.

Considerando as maiores titulações nos casos de coaglutinação e as amostras reagentes para um único sorovar, foram encontradas aglutininas anti-leptospira para três sorovares (tabela 4).

Tabela 4: Sorovares considerados reagentes nos anos de 2009 e 2012.

| Sorovar | Título | | | | Frequência absoluta | Frequência relativa (%) |
|--------------|----------|----------|----------|----------|---------------------|-------------------------|
| | 80 | 160 | 320 | 640 | | |
| Australis | 1 | 1 | - | 2 | 4 | 66,66 |
| Patoc | 1 | - | - | - | 1 | 16,67 |
| Copenhageni | - | 1 | - | - | 1 | 16,67 |
| Total | 1 | 2 | - | 2 | 6 | 100 |

Os sorovares encontrados foram Australis, Patoc e Copenhageni. Uma, das três amostras reagentes de 2009, apresentou título de 80 para o sorovar Patoc, outra o mesmo título para o sorovar Australis e a outra título de 160 para o sorovar Copenhageni. As três amostras referentes ao ano de 2012 foram reagentes para o sorovar Australis, tendo uma delas

apresentado título de 160 e as outras duas, título de 640. A frequência maior foi para o sorovar Australis, representando 66,66% (04/06) das reações.

Como explicado anteriormente, existiram problemas na leitura dos chips de identificação, no entanto houve um caso em que foi possível a correlação dos dados. Neste particular, a amostra referente ao ano de 2009 que reagiu para o sorovar Copenhageni (com título 160) pertence ao mesmo animal, que em 2012, apresentou reação para o sorovar Austrlis (com título 640).

6.1 ÁREA DE ESTUDO - ILHA DA MARAMBAIA

6.1.1 Visita ao local de estudo

Em visita à ilha, foi possível observar e registrar as condições gerais de habitação de alguns moradores da região. Neste tocante, grande parte da população da ilha vive em condições insalubres e precárias em seus domicílios (figura 09), outra parte dos habitantes civis, possuem residências um pouco melhor estruturadas (figura 10).



Figura 09: foto de uma residência em condições precárias de habitação na ilha^v.

^v Foto feita por Danielle Berniz, em visita a ilha no ano de 2012.



Figura 10: foto de uma residência melhor estruturada^{VI}.

Os moradores civis vivem nestas condições de habitação, além disto não usufruem do benefício da coleta de lixo eficiente, sendo este encontrado no peridomicílio, nas trilhas e próximo às praias (figuras 11 e 12).



Figura 11: Lixo ensacado próximo à beira da praia^V.

^{VI} Foto feita por Carmo⁸⁸, em visita a ilha no ano de 2012.



Figura 12: Zona de acumulação de lixo no peridomicílio^V.

Além das zonas de acúmulo, foi observada a ausência de tratamento adequado dos resíduos domésticos, sendo o esgoto lançado a céu aberto e próximo as moradias (figura 13).



Figura 13: Esgoto doméstico lançado no peridomicílio^V.

Durante a visita foi possível obter de informações a respeito das fontes e qualidade da água potável na região. Neste tocante, os civis a obtém diretamente da nascente, não existindo nenhum tipo de tratamento.

Poucas informações têm sido disponibilizadas nas bases de dados a respeito da ocorrência de leptospirose em municípios menores, como Mangaratiba e seu entorno, não existindo estudos ou notificações a respeito da ocorrência deste agravo na região da Ilha da Marambaia.

6.2 BUSCA DE CASOS EM ANIMAIS E HUMANOS

Com o auxílio de uma ficha cadastral, contendo os dados dos animais, que foi utilizada no projeto em que se realizou o inquérito para Leishmaniose visceral canina, foi possível ter acesso a informações como local de residência, idade aproximada, estado físico geral e imunização dos animais cujas amostras foram coletadas em 2012.

As três amostras reagentes são de cães pertencentes a proprietários diferentes, sendo dois deles residentes na praia Pescaria Velha e o outro na praia do Sítio (ambos apresentaram reação para o sorovar Australis). A figura 14 faz referência às duas praias onde os animais reagentes residem.

Um animal tinha idade inferior a 12 meses e os outros dois entre 1 e 7 anos. Todos os três animais apresentaram estado físico geral bom, mucosas normocoradas, nasceram na ilha e nenhum deles possuía histórico de vacinação.



Figura 14: Mapa da ilha da Marambaia (Google Earth): As marcações referem-se às praias e os respectivos sorovares que foram detectados em cães soropositivos para *Leptospira* sp. nos anos de 2009 e 2012. **A**: praia do Sítio, **J**: praia Pescaria Velha.

Como indicado no mapa os animais sororreagentes encontram-se nas extremidades da ilha, nas praias do Sítio (A) e Pescaria Velha (J).

Um animal da Pescaria Velha apresentou titulação 640 para o sorovar Australis. Outro animal residente na mesma praia, que em 2009 apresentou titulação 160 para o sorovar Copenhageni, em 2012 foi reagente para o sorovar Australis com título 640. Na praia do sítio, foi encontrada reação para o sorovar Australis em um animal, com titulação 640.

Em relação aos casos humanos, foram confirmados e registrados no SINAN, 284 casos de leptospirose no estado do Rio de Janeiro no ano de 2010, sendo este número aumentado para 422 casos no ano seguinte, sem notificações para o município de Mangaratiba em ambos os anos. Já no ano de 2012, este número foi reduzido para 185 casos no estado, tendo uma confirmação no município de Mangaratiba. Até o mês de março de 2013, foram confirmados 39 casos de leptospirose no estado sendo três deles em Mangaratiba, totalizando quatro casos no município desde 2010 até o período citado do presente ano. Destes, três casos são de área urbana e um de área rural, porém em ambos os casos a infecção foi adquirida em ambiente domiciliar.

Não existem registros oficiais de casos de leptospirose humana na ilha da Marambaia. Em conversa com a equipe médica local, não houve registros ou suspeitas de leptospirose em humanos na região. Possíveis casos de leptospirose animal foram investigados através de conversas com moradores e não há relatos de casos suspeitos nos animais. Além disto, foi questionada a presença de roedores e se haviam áreas de alagamento durante as chuvas. Poucos foram os relatos em relação aos roedores e quanto às áreas alagadas, estas não ocorrem próximo às casas, no entanto, há uma região na entrada da ilha em frente ao CADIM onde, após grande precipitação, geralmente ocorre alagamento.

7 DISCUSSÃO

Este estudo de caráter exploratório, realizado para pesquisa de aglutininas anti-leptospira em cães na ilha da Marambaia, foi o primeiro associado ao tema na região. Outros trabalhos utilizando provas sorológicas em amostras sanguíneas de cães neste local foram executados por Carmo⁸⁸ e Alonso^{VII}, todavia ambos buscaram possíveis casos de leishmaniose visceral nestes animais e apesar de algumas amostras terem reagido positivamente ao MAT no presente trabalho, nenhum dos animais apresentavam alteração clínica sugestiva de leptospirose. Esse fato é apoiado em trabalhos de outros autores que, assim como em nosso estudo, também encontraram sorologias positivas em cães clinicamente saudáveis^{101,102,103,104}.

Devido a quantidade insuficiente de soro de algumas amostras, utilizamos fatores de diluição alternativos e consideramos o limite de corte na diluição de 1:80, assim como Silva e colaboradores¹⁰⁵, que agiram de maneira semelhante ao usar a mesma diluição inicial empregada no presente trabalho, diferindo de Jaszczerski¹² que optou pela diluição inicial de 1:25. A literatura mostra que diferentes autores adotam limites de corte de 50 ou 100 para considerar uma amostra positiva, excluindo-se diluições menores que estariam na faixa de inespecificidade inerente a própria técnica^{34,76,106}. No entanto, esta questão ainda é controversa visto que Freire e colaboradores⁴³ consideram negativos títulos abaixo de 200 e Jaszczerski¹², considerou como soros reagentes aqueles que apresentaram qualquer reação ao MAT.

A análise dos resultados revelou a ocorrência de coaglutinação, em que um soro reagiu para mais de uma variante antigênica, o que pode ser indicativo de reação cruzada ou o resultado de infecção por mais de um sorovar. Tal hipótese só seria comprovada com o isolamento de *Leptospira* sp. e identificação dos sorovares na ilha, sendo assim, os sorovares detectados neste estudo foram: Australis, Copenhageni e Patoc, sendo o primeiro mais prevalente (66,66%). Outros inquéritos semelhantes, encontraram maior prevalência para o sorovar Copenhageni^{45,103}, entretanto, a maioria dos trabalhos realizados em cães no Brasil e no exterior assinalam predomínio das variantes Icterohaemorrhagiae e Canicola ao invés do sorovar Copenhageni¹⁰⁷. Admitindo-se a possível circulação de Australis e Copenhageni na ilha pelas evidências sorológicas, pode-se supor que haja reservatórios como roedores urbanos ou silvestres para a manutenção de Copenhageni e de reservatórios silvestres para a

^{VII} Tese de doutorado investigando leishmaniose visceral em cães na ilha da Marambaia, ainda não publicada.

manutenção de Australis. Masculli e colaboradores¹⁰³ e Favero e colaboradores⁴⁵ sugerem que a prevalência do sorovar Copenhageni aponta a importância da população de roedores na transmissão da doença. Weekes e colaboradores¹⁰⁸ encontraram prevalência para o sorovar Copenhageni, em cães na ilha de Barbados, provavelmente pelo contato com roedores locais responsáveis por manter o agente no ambiente, ressaltando a sua importância na ilha. Suepaul e colaboradores¹⁰⁹ também apontaram predominância do sorovar Copenhageni em roedores e em cães na Índia, levando a crer que os sorovares predominantes nos roedores e nos cães de um mesmo ambiente, sejam semelhantes¹⁰⁶.

Quanto à reação positiva para Patoc, um sorovar não patogênico incluído na bateria de antígenos, mas que é utilizado como marcador sorológico porque costuma reagir precocemente e apresenta reações cruzadas com sorovares não saprófitas¹¹⁰, poderia ser uma indicação da presença de algum sorovar patogênico não detectado no teste convencional. No entanto esta última hipótese não é consistente com base nos achados, visto que também poderia ser uma reação cruzada ou paradoxal em relação à Australis ou Copenhageni. Os resultados são esperados para situações ambientais semelhantes, onde existam os mesmos reservatórios e possibilidades de circulação da bactéria, mas possivelmente diferente em alguns aspectos dos achados em cães de áreas urbanas e rurais. Desvars e colaboradores¹¹¹ acreditam que a leptospirose no meio rural envolva interações complexas entre reservatórios de *Leptospira* domésticos, silvestres e o ambiente, diferindo das situações encontradas no meio urbano, onde a ocorrência deste agravo está associada ao crescimento desordenado das cidades, incluindo graves problemas de saneamento básico e consequente proliferação de roedores, considerados hospedeiros de manutenção de diversos sorovares, contribuindo para a contaminação ambiental o que permite infecção do cão e do ser humano^{8,112}.

A frequência dos achados (2,56%) no presente estudo é de modo geral bem menor do que de outros cenários observados na literatura, provavelmente devido às condições diferenciadas do local estudado. Lemos e colaboradores¹¹³ obtiveram 37% de soropositividade ao analisar 100 amostras de soro provenientes de cães no município de Aracajú. Masculli e colaboradores¹⁰³ encontraram 15% de positividade em 410 amostras de soro de cães, em São Paulo. Todavia, existem trabalhos que relatam prevalências na mesma faixa encontrada, como o de Jouglard e Brod¹¹⁴, que obtiveram frequência de 2,66% ao analisar 489 amostras provenientes de cães, só que de área rural, no município de Pelotas (RS), não sendo encontrando correspondência, relacionadas a esta frequência, em nenhuma outra bibliografia consultada referente ao mesmo tipo de ambiente. Os achados no presente estudo diferem também dos encontrados por Desvars e colaboradores¹¹⁵, supondo que a soroprevalência da

doença seja maior em pequenas ilhas, do que no continente ou em ilhas maiores, no entanto, com um número de sorotipos circulantes menor. Deve-se chamar a atenção novamente para as peculiaridades da área estudada. Trata-se de uma ilha no Oceano Atlântico, portanto observa-se relativo isolamento do continente, com densidade populacional humana e de cães limitadas pela condições de vida e trabalho do local. Assim sendo, seria esperado que os resultados não fossem comparáveis com áreas urbanas ou rurais onde as diferenças nas prevalências encontradas explicam-se em parte pelas condições diferenciadas do ecótopo, do mesmo modo que as concentrações populacionais de reservatórios e/ou portadores de leptospiras (roedores e cães) são muito maiores no meio urbano do que no rural¹¹⁴. A diversidade limitada de sorovares encontrados em cada área insular é absolutamente específica para aquele ambiente e por um lado, podem ser diretamente correlacionada com a diversidade faunística da área e, por outro, com a sua diversidade ambiental¹¹⁵.

No presente trabalho os objetos de estudo estão inseridos em um ambiente insular, o que requer uma abordagem regional diferenciada, sendo encontrados na literatura, raros trabalhos com cães em meio semelhante. Weeks¹⁰⁸ realizou estudo similar, na ilha de Barbados, onde encontrou alta prevalência em cães com suspeita de leptospirose, apontando para importância da espécie e do ambiente na epidemiologia desta doença. Das poucas referências encontradas, a maior parte busca a investigação de casos em humanos ou isolamento e identificação de cepas em outras espécies, como realizado por Gonçalves¹¹⁶ que estudou a caracterização dos primeiros isolados de *Leptospira* sp. em humanos e em roedores na ilha de São Miguel, em Portugal, encontrando positividade em ambos e Moraes e colaboradores¹¹⁷, que encontraram anticorpos para sorovares patogênicos em equídeos criados na ilha de Algodal, estado do Pará. Para Rubel e colaboradores¹¹⁸, que também realizaram estudo em cães, a prevalência de uma sorovariedade de *Leptospira* em uma região, bem como os fatores de risco associados a ela, estão na dependência de diversos fatores como a densidade populacional do reservatório animal e o ecossistema no qual vive o cão, sugerindo inclusive, que em determinados locais, são as condições sanitárias criadas pelo homem que favorecem a manutenção de ciclos de transmissão. Para Desrvars e colaboradores¹¹⁵ os sorovares de *Leptospira* circulantes em animais numa ilha são específicos para as espécies que colonizam este ambiente e geralmente são encontrados em outras partes do mundo, no entanto, cada ilha representa um ecossistema único.

Os cães da ilha, em sua grande maioria, não apresentam restrição de movimentação, possuindo acesso às matas devido ao deslocamento dos seus proprietários. Como descrito por Silveira⁹⁹ existe a presença de animais silvestres na região, roedores de pequeno e maior porte

como capivaras, pequenos mamíferos, primatas, répteis e anfíbios, o que pode favorecer a diversidade de sorovares e aumentar a possibilidade de infecção canina. Além disto, a Marinha do Brasil não permite o trânsito de animais entre a ilha e o continente, logo, os animais sororeagentes, nasceram na ilha, o que reforça a possibilidade de circulação da bactéria no local.

Apesar de não haver uma lista da fauna associada a área descrita na literatura, é sabido que esta zoonose, caracteristicamente, pode estar presente em várias espécies animais servindo como portadores ou reservatórios de leptospiras. Exemplos desta variabilidade podem ser demonstrados por Souza Junior e colaboradores¹¹⁹, que encontraram positividade para os sorovares Pomona, Grippothyphosa, Autumnalis, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, entre outros, em amostras de soro sanguíneo de primatas no estado de Tocantins. Em estudo semelhante, Pimentel e colaboradores¹²⁰, encontraram o sorovar Copenhageni em primatas, raposas e guaxinins no estado de Aracajú, SE. No Brasil, já foram observadas reações para este sorovar em javalis¹²¹, capivaras⁵⁷ e em veado-campeiro⁵³, desta maneira outras espécies também podem estar participando da cadeia epidemiológica de determinados sorovares.

Nos trabalhos de campo, foi possível observar diferentes espécies como equinos, suínos, felinos, aves e primatas na ilha estudada. Moradores relatam a presença de capivaras no local, dado reforçado por Silveira⁹⁵, estes animais muitas vezes são caçados e servem de alimento aos moradores e indiretamente, aos cães. De Paula¹²² encontrou soropositividade para os sorovares Copenhageni, Icterohaemorrhagiae e Patoc, em capivaras de vida livre no campus da Escola Superior de Agricultura “Luis de Queirós” da Universidade de São Paulo e Shimabukuro¹²³ no mesmo estado, encontrou positividade para diversos sorovares, incluindo o Copenhageni, também em capivaras, indicando a participação da espécie no ciclo silvestre da doença¹²⁴. Como já relatado, os cães da ilha estudada, têm acesso às matas e apresentaram aglutininas anti-leptospira para o sorovar em questão, o que sugere possível contato com estes animais. Os sorovares encontrados em capivaras por diferentes autores revelam semelhanças aos encontrados nos caninos no presente estudo (Australis, Patoc e Copenhageni). Os resultados desta pesquisa corroboram com achados de Jouglard e Brod¹¹⁴ que encontraram positividade para sorovares considerados acidentais para cães, como o Australis. Em regiões particulares, os hospedeiros responsáveis por manter a circulação do agente no ambiente, são frequentemente espécies silvestres e por vezes, animais domésticos e de produção^{4,114}.

Os títulos relevantes encontrados no presente estudo variaram entre 80 e 640, e títulos contra um único sorovar ou os que são considerados baixos (100 e 200), podem ser encontrados em amostras de indivíduos convalescentes como título residual de infecção

prévia ou em casos de infecção recém-instalada e podem ser significantes em animais não vacinados^{125,126}. Nenhum animal no momento da coleta apresentou características ou sintomatologia clínica sugestivas de leptospirose, tratando-se, portanto de animais assintomáticos e com estado físico geral bom. Almeida e colaboradores¹²⁷, afirmam que títulos a partir de 1:100 indicam efetividade vacinal, no entanto nenhum dos animais deste estudo possui histórico de imunização, o que sugere contato natural com o antígeno.

A ocupação da ilha por parte da Marinha modificou os hábitos dos ilhéus e sua dinâmica social, eles foram impedidos de construir, reformar ou ampliar moradias. Por outro lado, a presença do comando militar preocupa-se com a preservação, principalmente da fauna e flora da região^{89, 128}.

No presente trabalho foram encontradas condições sanitárias precárias da população residente na ilha e habitações em estado de conservação ruim, além da má qualidade da água para consumo e da não existência de tratamento adequado dos resíduos domésticos, observando-se a presença de esgoto a céu aberto no peridomicílio. Reis e Colaboradores³⁸ evidenciaram um risco maior de exposição à infecção entre pessoas que residem em locais a menos de 20 metros de esgoto lançado a céu aberto, confirmando a importância da localização da residência em áreas com precárias condições de saneamento. Além desta questão, Costa¹²⁹ identificou como fator de risco para infestação de roedores e transmissão de leptospirose, casa com paredes sem reboco. A precariedade da conservação do meio ambiente tem uma ligação íntima com a casuística de leptospirose e os principais problemas relacionados à doença são constituídos pelo acúmulo de entulho, drenagem ineficiente de esgoto, condições sanitárias e de infraestrutura precárias, além do clima úmido^{130,131}, sugerindo que o ambiente onde residem os moradores e seus animais na ilha seja propício para a manutenção da *Leptospira* spp. As atividades de treinamento realizadas pela Marinha do Brasil e o trânsito de pessoas na ilha culminam em alterações ambientais, e para Confalonieri e colaboradores¹³² as transformações resultantes da ação antrópica contribuem para as modificações na natureza, podendo afetar a saúde humana. Grupos populacionais com importantes problemas socioeconômicos, como a falta de saneamento básico, estão mais susceptíveis à doenças, em particular, a leptospirose⁶¹.

No tocante às condições climáticas da ilha, as chuvas são comuns na região, havendo excedente hídrico praticamente todo o ano. A ocorrência de precipitação pluviométrica se dá em sua maior parte, durante o verão e a umidade relativa do ar durante todo o ano fica próxima a 81%, isto se dá em consequência da posição geográfica local¹³³. Durante períodos de elevada precipitação pluviométrica, o solo permanece úmido podendo levar a formação de

poças d'água, o que favorece a sobrevivência da bactéria no ambiente durante um período prolongado, levando a um aumento da exposição humana e animal ao micro-organismo^{111, 117, 118 134}. Ainda que não existam registros de áreas de alagamento próximo às residências, há relatos de áreas alagadas e com presença de lama após chuvas intensas.

Casos humanos foram investigados no SINAN entre os anos de 2010 até o mês de março de 2013 (mês citado no SINAN) e foram observados casos isolados de leptospirose humana na região de Mangaratiba. Em 2010 e 2011 não houve registros, já em 2012, ocorreu um caso e até o mês de março do presente ano, foram três casos confirmados da doença no município. Apesar de não existirem relatos de casos humanos ou animais de leptospirose na ilha da Marambaia, a região possui um ambiente propício para manutenção da *Leptospira* spp. no local de estudo e para a possível ocorrência de infecções em cães e em humanos.

No momento da coleta nenhum animal apresentou sintomatologia clínica compatível com a leptospirose. A sorologia positiva e com títulos relativamente baixos pode indicar anticorpos residuais, com infecção anterior, ou atual, mas assintomática, no momento da coleta. Admite-se ainda que os cães possam ser portadores da bactéria por um período prolongado, ainda que não apresentem sinais sugestivos de infecção e, nesse caso, poderiam apresentar risco para a população humana. Os resultados sorológicos nos cães indicam a possibilidade de infecção em outras espécies não estudadas e na população humana e são comumente encontrados em inquéritos sorológicos^{6, 9, 34, 135}.

8 CONCLUSÕES

- 1- As características ambientais da ilha favorecem ciclos de transmissão entre os animais e destes para o homem;
- 2- A detecção de sorovares de *Leptospira* spp. em cães da Ilha de Marambaia indica a possibilidade de circulação de cepas patogênicos na área, podendo ser indicações de focos silvestres (*Australis*) e de possibilidades mais características de aglomerações urbanas que teriam reservatórios como *Rattus norvegicus* e *Rattus rattus* como potenciais reservatórios do sorovar Copenhageni.
- 3- Não há casos caninos e nem humanos relatados na ilha da Marambaia.

9 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Realização de inquérito bacteriológico visando o isolamento e identificação da bactéria nos potenciais reservatórios da ilha;
- Realização de inquérito sorológico e epidemiológico em humanos;
- Realização de um levantamento da fauna silvestre da ilha.

REFERÊNCIAS

- ¹ Sarkar U, Nascimento SF, Barbosa R, Martins R, Nuevo H, Kalofonos H, et al. Population-based case-control investigation of risk factors for leptospirosis during an urban epidemic. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2002; 66 (5), 605-610p.
- ² Brenner DJ, Kaufmann AF, Sulzer KR, Steigerwalt AG, Faye C. Rogers FC, et al. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1999; 49 (2), 839-858p.
- ³ Zuerner R, Haake D, Adler B, Segers R. Technological advances in the molecular biology of *Leptospira*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 2000; 2, 455-462p.
- ⁴ Bolin CA. Diagnosis of leptospirosis: a reemerging disease of companion animals. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery small animal*. 1996; 11 (3), 166-171.
- ⁵ Brasil. Guia de vigilância epidemiológica. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, 7.ed, Caderno 8. 2010. 15-32p.
- ⁶ Batista CSA, Azevedo SS, Alves CJ, Vasconcellos AS, Morais ZM, Clementino IJ, et al. Soroprevalência de leptospirose em cães errantes da cidade de Patos. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 2004; 41 (2), 131-136p.
- ⁷ Brasil. Cadernos de atenção básica. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica, 1.ed, Brasília. 2009a; 225p.
- ⁸ Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira* and leptospirosis. 3.ed. Melbourne: MediSei. 1999; 272p.
- ⁹ Levett P. N. Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 2001; 14(2), 296p.
- ¹⁰ Hartskeerl RAM, Pereira MC, Ellis WA. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. *Clinical Microbiology and Infection*. 2011; 17 (4), 494-501p.
- ¹¹ Brasil. Manual de leptospirose. Coordenação de Controle de zoonoses e Animais Peçonhentos. 3.ed, Brasília. 1997; 98p.
- ¹² Jaszczerski DCFS. Cinética da resposta imune humoral em cães imunizados com *Leptospira interrogans* sorovares Icterohaemorrhagiae, Canicola, Pomona e Grippotyphosa. [dissertação]. [Paraná (PR)]: Universidade Federal do Paraná, 2005. 82p.
- ¹³ Jouglard SDD. Diagnóstico de leptospirose por PCR e caracterização de isolados de *Leptospira* spp. por sequenciamento do 16s rDNA e análise de VNTR. [tese]. [Rio Grande do Sul (RS)]: Universidade Federal de Pelotas, 2005. 71p.
- ¹⁴ Ribeiro MA. Contribuição ao Imunodiagnóstico da Leptospirose Humana: ênfase ao uso de anticorpos monoclonais. [tese]. [São Paulo (SP)]: Universidade de São Paulo-USP. 2003; 160p.

-
- ¹⁵ Brasil. Relatório de situação-Rio de Janeiro. Sistema Nacional De Vigilância Em Saúde. 5ª edição. 2011a. 17p.
- ¹⁶ Paster BJ, Dewhirst FE, Weisburg WG, Tordoff LA, Fraser GJ, Hespell RB, et al. Phylogenetic analysis of the spirochetes. *Journal of Bacteriology*. 1991; 173 (19), 6101-6109p.
- ¹⁷ Quinn P. J, Carter ME, Markey B, Carter GR. *Clinical veterinary microbiology*. London: Wolfe, 1994.
- ¹⁸ Valverde MDEL, Ramírez JM, Montes de Oca LG, Goris MG, Ahmed N, Hartskeerl RA. Arenal, a new *Leptospira* serovar of serogroup Javanica, isolated from a patient in Costa Rica. *Infection, Genetics and Evolution*. 2008; 8 (5), 529-533p.
- ¹⁹ Brasil. Leptospirose: Diagnóstico e Manejo Clínico. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 2009b; 34p.
- ²⁰ Gomes MJP. Gênero *Leptospira* spp. UFRGS [periódico na internet]. 2013 [acesso em 15 de jun de 2013]. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/labacvet/files/G%C3%AAnero%20Leptospira%204-2013-1.pdf>
- ²¹ Macedo N. A. Influência da via de inoculação sobre o estabelecimento e a evolução da leptospirose em Hamsters (*Mesocricetus auratus*) experimentalmente infectados com *L. interrogans* Sorotipo Pomona. [dissertação]. [São Paulo (SP)]: 1991, 45p.
- ²² Cerqueira GM, Picardeau M. A century of *Leptospira* strain typing. *Infection, Genetics and Evolution*. 2009; 9 (5), 760-768p.
- ²³ Corney BG, Slack AT, Symonds ML, Dohnt MF, McClintock CS, McGowan MR, et al. *Leptospira weilii* serovar Topaz, a new member of the Tarassovi serogroup isolated from a bovine source in Queensland, Australia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2008; 58 (10), 2249-2252p.
- ²⁴ Zuerner R, Haake D, Adler B, Segers R. Technological advances in the molecular biology of *Leptospira*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 2000; 2, 455-462p.
- ²⁵ Herrmann JL, Baril C, Bellenger E, Perolat P, Baranton G, São Girons I. Genome conservation in isolates of *Leptospira interrogans*. *Journal of Bacteriology*. 1991; 173 (23), 7582-7588p.
- ²⁶ Who. World Health Organization. Human leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control. Geneva, Switzerland. 2003; 109p.
- ²⁷ Euzeby, J. P. [homepage na internet]. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature – Genus *Leptospira*. [Acesso em 15 de jun de 2013]. Disponível em: www.bacterio.cict.fr/l/leptospira.html
- ²⁸ Garcia M, Martins LS. [homepage na internet]. Leptospirose. [acesso em 17 de nov de 2012]. Disponível em: http://www.mgar.vet.br/zoonosesaulas/aula_leptospirose.htm

-
- ²⁹ Vasconcellos S. A, Barbarini Jr O, Umehara O, Morais ZM, Cortez A, Pinheiro SR, et al. Leptospirose bovina. Níveis de ocorrência e sorotipos predominantes em rebanhos dos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul. Período de janeiro a abril de 1996. Arquivos do Instituto Biológico. 1997; 64 (2), 7-15p.
- ³⁰ Brasil. Manual de controle de roedores. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Brasília, 2002; 125p.
- ³¹ Haake DA. Molecular epidemiology of leptospirosis in the Amazon. PLOS Medicine. 2006; 3 (8), 302p.
- ³² Machado FME, Coelho HE, Rezende RS. Plano de ação para o controle da leptospirose no zoológico municipal de Uberaba-MG. Bioscience Journal. 2010; 26 (6), 981-989p.
- ³³ Brown k, Prescott J. Leptospirosis in the family dog: a public health perspective. Canadian Medical Association Journal. 2008; 178 (4), 399-401p.
- ³⁴ Batista CSA, Azevedo SS, Vasconcellos AS, Morais ZM, Clementino IJ, Alves FAL, et al. Soroprevalência e fatores de risco para a leptospirose em cães de Campina Grande, Paraíba. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2005; 57(2), 179-185p.
- ³⁵ Sinan. Sistema de Informações de Agravos de Notificação. [acesso em 12 de maio de 2013]. Disponível em: <http://dtr.saude.gov.br/sinanweb>
- ³⁶ Farr R. W. Leptospirosis. Clinical Infectious Diseases. 1995; n.21, 1-8p.
- ³⁷ Barcellos C, Sabroza PC. The place behind the case: leptospirosis risks and associated environmental conditions in a flood-related outbreak in Rio de Janeiro. Cadernos de Saúde Pública. 2001; 17, 59-67p.
- ³⁸ Reis Renato B. Ribeiro GS, Ko AI. Impact of environment and social gradient on *Leptospira* infection in urban slums. PLoS neglected tropical diseases. 2008; 2 (4), 228p.
- ³⁹ Souza W. Doenças negligenciadas. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro. 2010; 43p.
- ⁴⁰ Hotez PJ, Molineux DH, Fenwick A, Kumaresan JMB, Sachs SE, Sachs JD, et al. Control of neglected tropical diseases. New England Journal of Medicine. 2007; 357 (10), 1018-1027p.
- ⁴¹ Tassinari W, Pellegrini DCP, Sabroza PC; Carvalho MS. Distribuição espacial da leptospirose no Município do Rio de Janeiro, Brasil, ao longo dos anos de 1996-1999. Cadernos de Saúde Pública. 2004; 20 (6), 1721-1729p.
- ⁴² Brasil. Análise da situação das doenças transmissíveis no Brasil no período de 2000 a 2010. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2011b. 71-73p.

-
- ⁴³ Freire IMA, Vargas RG, Gomes YNP, Pombo CR, Lilenbaum W. Distribuição dos sorovares de *Leptospira* em caninos clinicamente suspeitos no Rio de Janeiro. *Revista Brasileira Ciência Veterinária*. 2007; 14 (2), 83-85p.
- ⁴⁴ Bharti AR, Jarlath EN, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infection Disease*. 2003; 3 (12), 757-771p.
- ⁴⁵ Favero, M, Pinheiro SR, Vasconcellos SA, Morais ZM, Ferreira F, Ferreira Neto JS. Sorovares de *Leptospiras* predominantes em exames sorológicos de bubalinos, ovinos, caprinos, equinos, suínos e cães de diversos estados brasileiros. *Ciência Rural*. 2002; 32 (4), 613-619p.
- ⁴⁶ Favero M, Pinheiro SR, Vasconcellos AS, Morais ZM, Ferreira F, Ferreira Neto JS. Leptospirose bovina: variantes sorológicas predominantes em colheitas efetuadas no período de 1984 a 1997 em rebanhos de 21 estados do Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo*. 2001; 6 (2), 29-35p.
- ⁴⁷ Lage AP, Leite MH, Thompson JA, Bandeira DA, Herrmann GP, Moreira EC, et al. Serology for *Leptospira* sp. in cattle of the State of Paraíba, Brazil. *Arquivos do Instituto Biológico*. 2007; 74 (3), 185-190.
- ⁴⁸ Lilenbaum W, Souza GN. Factors associated with bovine leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Research in Veterinary Science*. 2003; 75 (3), 249-251p.
- ⁴⁹ Sobestiansky J Barcellos DES, Mores N, de Oliveira SJ, Carvalho AM, Moreno AM, et al. *Clínica e Patologia Suína*. 2ed. Goiânia: Universidade Federal de Goiás. 1999; 464p.
- ⁵⁰ Carvalho SM, Gonçalves LMF, Macedo NA, Goto H, Silva SMMS, Mineiro ALBB. Infecção por leptospiras em ovinos e caracterização da resposta inflamatória renal. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2011; 31 (8), 637-642p.
- ⁵¹ Acha PN, Szyfres B. *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y los animales* 3. ed. Washington: Organización Panamericana, 2001. 384p.
- ⁵² Larsson CE, Santa Rosa CA, Larsson MH, Birquel EH, Fernandes WR, Paim GV. Laboratory and clinical features of experimental feline leptospirosis. *International Journal of Zoonoses*. 1985; 12 (2), 111-119.
- ⁵³ Girio RJS, Pereira FLG, Marchiori Filho M, Mathias LA, Herreira RCP, Alessi AC, et al. Pesquisa de anticorpos contra *Leptospira* spp. em animais silvestres e em estado feral da região de Nhecolândia, Mato Grosso do Sul, Brasil. Utilização da técnica de imunohistoquímica para detecção do agente. *Ciência Rural*. 2004; 34 (1), 165-169p.
- ⁵⁴ Esteves FM, Guerra-Neto G, Girio RJS, Silva-Vergara ML, Carvalho ACFB. Detecção de anticorpos para *Leptospira* spp. em animais e funcionários do zoológico municipal de Uberaba, MG. *Arquivos do Instituto Biológico São Paulo*. 2005; 72 (3), 283-288p.

-
- ⁵⁵ Cordeiro F, Sulzer CR, Ramos AA. *Leptospira interrogans* in several wildlife species in southeast Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 1981, 1 (1), 19-29p.
- ⁵⁶ Santa Rosa CA, Sulzer CR, Yanaguita RM, Da Silva AS. Leptospirosis in wildlife in Brazil: isolation of serovars canicola, pyrogenes and grippotyphosa. *International Journal of Zoonosis*. 1980; 7 (1), 40-43p.
- ⁵⁷ Milagres BS. Perfil sorológico de algumas infecções em capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) capturadas nos estados de São Paulo e Minas Gerais, Brasil. [dissertação]. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa. 2004; 65p.
- ⁵⁸ Mello LP, Manhoso FFR. Aspectos epidemiológicos da leptospirose canina no Brasil. *Unimar Ciências*. 2007; 16 (1-2), 27-32p.
- ⁵⁹ Rende JC, Ávila FA. Leptospirose bovina: perfil epidemiológico e dinâmica da infecção como zoonose. *ARS Veterinária*. 2003; 19 (1), 71-79p.
- ⁶⁰ São Paulo. Manual do educador: “Criando um amigo”- Manual de Prevenção contra agressões por cães e gatos. Centro de Controle de Zoonoses, Gerência de Vigilância Ambiental – Coordenadoria de Vigilância em Saúde, Secretaria Municipal da Saúde, São Paulo, SP. 2004; 32p.
- ⁶¹ Magalhães DF, Silva JA, Moreira EC, Wilke VML, Nunes ABV, Haddad JPA, et al. Perfil dos cães sororreagentes para aglutininas anti-*Leptospira interrogans* em Belo Horizonte, Minas Gerais, 2001/2002. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2007; 59 (5), 1326-1329p.
- ⁶² Oliveira ST. Leptospirose canina: Dados clínicos, laboratoriais e terapêuticos em cães naturalmente infectados. [tese]. [Porto Alegre (RS)]: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2010; 89p.
- ⁶³ Wohl J. S. Leptospirose canina. *Fort Dodge saúde animal Ltda*. 18 (11). 1996; 1215-1241p.
- ⁶⁴ Birchard SJ, Sherding RG. *Manual Saunders. Clínica de pequenos animais*, São Paulo-SP, Editora Roca. 2003; 3, 734-735p.
- ⁶⁵ Hagiwara MK. Leptospirose canina. *Boletim técnico*. São Paulo, FMVZ-USP. Pfizer Saúde Animal, 2003; 6p.
- ⁶⁶ Vasconcellos AS, Barbarini Jr O, Umehara O, Morais ZM, Cortez A, Pinheiro SR, et al. Leptospirose. Brasília: Ministério Da Saúde, F. N. S. Guia Brasileiro De Vigilância Epidemiológica 4ed. 1998; 213-222p.
- ⁶⁷ Fort Dodge [homepage na internet]. A nova realidade da leptospirose no Brasil. [acesso em 18 de nov de 2012]. Disponível em: <http://www.leptospirosenobrasil.com.br>
- ⁶⁸ Salles RS, Lilenbaum W. Leptospirose bovina no Brasil. *Revista CFMV*, Brasília. 2000; 21, 42-46p.

-
- ⁶⁹ Camargo ED, Da Silva MV, Batista L, Vaz AJ, Sakata EE. Avaliação do teste ELISA-IgM no diagnóstico precoce da leptospirose humana. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 1992; 34 (4), 355-357p.
- ⁷⁰ Freitas JC, Silva FG, Oliveira RC, Delbem ACB, Muller EE, 1 Alves LA, et al. Isolation of *Leptospira* spp. from dogs, bovine and swine naturally infected. *Ciência Rural*. 2004; 34 (3), 853-856 p.
- ⁷¹ Veronesi R, Focaccia R. *Tratado de Infectologia*. São Paulo. Ed Atheneu. v2. 2009; 694p.
- ⁷² Merien F, Baranton G, Perolat P. Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. *Journal of Infectious Diseases*. 1995; 172 (1), 281-285p.
- ⁷³ Yan KT, Ellis WA, Mackie DP, Taylor MU, McDowell SWJ, Montgomery JM. Development of ELISA to detect to a protective lipopolysaccharide fraction of *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo in cattle. *Veterinary Microbiology*. 1999; 69 (3), 173-187p.
- ⁷⁴ Wilson T, Carson J, Bowman J. Optimisation of one-tube PCR-ELISA to detect femtogram amounts of genomic DNA. *Journal of Microbiological Methods*. 2002; 51 (2), 163-170p.
- ⁷⁵ Bey RF, Johnson RC. Humoral immune response of dogs vaccinated with leptospiral pentavalent outer envelope and whole culture vaccines. *American Journal of Veterinary research*. 1978; 39 (5), 831p.
- ⁷⁶ Avila MO, Furtado LRI, Teixeira MM, Rosado RLL, Brod CS. Aglutininas anti-leptospíricas em cães na área de influência do centro de controle de zoonoses, Pelotas, RS, Brasil, no ano de 1995. *Ciência Rural*, Santa Maria. 1998; 28 (1), 107-110p.
- ⁷⁷ Brod CS, Aleixo JAG, Jouglard SDD, Fernandes CPH, Teixeira JLR, Dellagostin AO. 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*, Pelotas. 2005; 38 (4), 294-300p.
- ⁷⁸ Mitchison M, Bulach DM, Vinh T, Rajakumar K, Faine S, Adler B. Identification and characterization of the dTDP-rhamnose biosynthesis and transfer genes of the lipopolysaccharide-related rfb locus in *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *Journal of Bacteriology*. 1997; 179 (4), 1262-1267p.
- ⁷⁹ Marinho M, Langoni H, Oliveira SL, Carreira R, Perri SHV, Luvizoto MC. Resposta humoral, recuperação bacteriana e lesões histológicas em camundongos geneticamente selecionados para bons e maus produtores de anticorpos e *balb/c*, frente à infecção por *Leptospira interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2003; 23 (1), 5-12p.
- ⁸⁰ Marinho M. Leptospirose: Fatores epidemiológicos, fisiopatológicos e imunopatogênicos. *Veterinária e Zootecnia*. 2008; 15 (3), 428-434p.

-
- ⁸¹ McBride AJ, Athanazio DA, Reis MG, Ko AI. Leptospirosis. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2005;18 (5), 376–386p.
- ⁸² Andrade SF. *Manual de terapêutica veterinária*. 3. ed, São Paulo, Roca. 2008.
- ⁸³ Klaasen HLBM, Molkenboer MJCH, Vrijenhoek MP, Kaashoek MJ. Duration of immunity in dogs vaccinated against leptospirosis with a bivalent inactivated vaccine. *Veterinary Microbiology*. 2003; 95(1), 121-132.
- ⁸⁴ Gamberini M, Gómez RM, Atzingen MV, Martins EAL, Vasconcellos SA, Romero EC, et al. Whole-Genome Analysis of *Leptospira interrogans* to identify potential vaccine candidates against leptospirosis. *FEMS Microbiological Letters*. 2005; 244, 305-313p.
- ⁸⁵ Nelson RW, Couto CG. *Medicina interna de pequenos animais*. Tradução de Aldacilene Souza da Silva et al. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier. Título original: *Small animal internal medicine*. 2006; 1324p.
- ⁸⁶ Brasil. *Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso*. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 4. ed, Brasília. 2004; 328p.
- ⁸⁷ Informe Ensp [homepage na internet]. ENSP e a Marinha do Brasil firmam compromisso na ilha da Marambaia. [acesso em 18 de out de 2011] Disponível em: <http://www.ensp.fiocruz.br/portal-ensp/informe/materia/>.
- ⁸⁸ Carmo LAL. Monitoramento sorológico de novos casos de leishmaniose visceral canina e avaliação da fauna flebotomínica na Ilha da Marambaia, município de Mangaratiba, RJ. [dissertação]. [Rio de Janeiro]. Fundação Oswaldo Cruz. 2013; 40p.
- ⁸⁹ Pereira LA, Xerez R, Pereira AMC. Ilha da Marambaia (Baía de Sepetiba, RJ): Resumo fisiográfico, histórico e importância ecológica atual. *Ciência e Cultura*. 1990; 42, 384-389p.
- ⁹⁰ Conde MMS, Lima HRP, Peixoto AL, Menezes LFT, Peixoto AL, Araújo DSD. Aspectos florísticos e vegetacionais da Marambaia, Rio de Janeiro, Brasil. In: Menezes LFT, Peixoto AL, Araújo DSD. *História Natural da Marambaia*. Rio de Janeiro: Editora da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2005; 133-168 P.
- ⁹¹ Poggio G. [homepage na internet]. CADIM: Centro de Adestramento da Ilha da Marambaia. Setembro de 2010. [acesso em 16 de abril de 2012]. Disponível em: www.forte.jor.br
- ⁹² Rambaldi DM, Oliveira, D. Fragmentação de ecossistemas: causas, efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas. Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Biodiversidade e Florestas. 2003; 510p.
- ⁹³ Nóbrega LA. Marambaia: imaginário e história. *Rev. Univ. Rural, Série: Ciências Humanas*. 2004; 26 (1-2), 115-123p.

-
- ⁹⁴ Marinha do Brasil [homepage na internet]. A Marinha do Brasil nas ações cívico sociais na ilha da Marambaia. [acesso em 28 de set de 2011]. Disponível em: <http://www.mar.mil.br/cgcfm/marambaia/>
- ⁹⁵ Silveira AK. Caracterização de ecossistemas com potenciais de risco para infestação por carrapatos e transmissão de riquetsias para humanos no estado do Rio de Janeiro. [dissertação]. [Rio de Janeiro (RJ)]. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2010; 38p.
- ⁹⁶ Carvalho ALG, Araújo AFB, Silva HR. Lagartos da Marambaia, um remanescente insular de Restinga e Floresta Atlântica no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Biota Neotropica*. 2007; 7 (2), 221-226p.
- ⁹⁷ Galton MM, Sulzer CRS, Santa Rosa CA, Michael J. Fields MJ. Application of a microtechnique to the agglutination test for leptospiral antibodies. *Applied Microbiology*. 1965; 13 (1), 81-85.
- ⁹⁸ Cole JR, Sulzer CR, Pursell AR. Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test. *Applied Microbiology*. 1973; 25 (6), 976-980p.
- ⁹⁹ Nogueira JMR, Miguel LFS. Bacteriologia. In: Molinaro, E.M. et al. Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde. Rio de Janeiro: Fiocruz. 1.ed. 2010; 4, 221-397p.
- ¹⁰⁰ Céspedes MZ. Leptospirosis: Enfermedad Zoonótica Emergente. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*. 2005; 22, 290-307p.
- ¹⁰¹ Lemos JP, Melo CB, Viegas SARA. Análise sorológica de *Leptospira* spp. em cães errantes no município de Aracaju. *Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária*. 2010; 14 (3), 16p.
- ¹⁰² Silva WB, Simões LB, Padovani CR, Langoni H, Lopes ALS, Modolo JR. Inquérito sorológico e distribuição espacial da leptospirose canina em área territorial urbana da cidade de Botucatu, São Paulo. *Vet. E Vet. E Zootec*. 2009; 16 (4), 656-668p.
- ¹⁰³ Mascoll RSR, Pinheiro AS, Vasconcellos F, Ferreira ZM, Morais CO, Pinto MCA, 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*. 2002; 69 (2), 25-32 p.
- ¹⁰⁴ Lopes ALS, Silva WB, Padovani CR, Langoni H, Modolo JR. Frequência sorológica antileptospírica em cães: sua correlação com roedores e fatores ambientais, em área territorial urbana. *Arquivos do Instituto Biológico*. 2005; 72 (3), 289-296p.
- ¹⁰⁵ Silva FJ, Mathias LA, Magajevski FS, Werther K, Assis NA, Girio RJS. Anticorpos contra *Leptospira* spp. Em animais domésticos e silvestres presentes no campus universitário da FCAV, UNESP, Jaboticabal/SP. *Ars Veterinaria*. 2010; 26 (1), 17-25p.
- ¹⁰⁶ Castro JR, Salaberry RSR, Souza MAS, Ribeiro AMCL. Sorovares de *Leptospira* spp. predominantes em exames sorológicos de caninos e humanos no município de Uberlândia,

Estado de Minas Gerais. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2011; 44 (2), 217-222p

¹⁰⁷ Scanziani E, Calcaterra S, Tagliabue S, Luini M, Giusti AM, Tomba M. Serological findings in cases of acute leptospirosis in the dog. Journal of Small Animal Practice. 1994; 35 (5), 257-260p.

¹⁰⁸ Weekes CC, Everard COR, Levett PN. Seroepidemiology of canine leptospirosis on the island of Barbados. Veterinary Microbiology. 1997; 51, 215-222p.

¹⁰⁹ Suepaul SM, Carrington CFV, Campbell M, Borde G, Adesiyun AA. Serovars of *Leptospira* isolated from dogs and rodents. Epidemiol Infect. 2010; 138, 1059-1070p.

¹¹⁰ Aguiar DM, Cavalcante GT, Vasconcellos AS, Souza GO, Labruna MB, Camargo LMA, et al. Anticorpos anti-*leptospira* spp. em ovinos do município de Monte Negro, estado de Rondônia. Arquivos do Instituto Biológico. 2010; 77 (3), 529-532p.

¹¹¹ Desvars A, Jégo S, Chiroleu F, Bourhy P, Cardinale E, Michault A. Seasonality of human Leptospirosis in Reunion Island (Indian Ocean) and its association with meteorological data. PLoS ONE. 2011; 6 (5), 10p.

¹¹² Querino AMV, Ádina Cléia Botazzo Delbem ACB, Oliveira RC, Silva FG, Müller EE, Freire RL, et al. Fatores de risco associados à leptospirose em cães do município de Londrina-RO. Semina. 2003, 24, 27-34p.

¹¹³ Lemos JP, Melo CB, Viegas SARA. Análise sorológica de *Leptospira* spp. em cães errantes no município de Aracaju. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária. 2010; 14 (3), 1-16p.

¹¹⁴ Jouglard SDD, Brod CS. Leptospirose em cães: prevalência e fatores de risco no meio rural do município de Pelotas, RS. Arquivo do Instituto Biológico. 2000; 67(2), 181-185p.

¹¹⁵ Desvars A, Cardinale E, Michault A. Animal leptospirosis in small tropical areas. Epidemiology and Infection. 2011; 139 (2). 167–188p.

¹¹⁶ Gonçalves ATS. Leptospirose em São Miguel: caracterização dos primeiros isolados humanos de *Leptospira* sp. e diferenciação molecular de estirpes isoladas dos principais reservatórios silváticos. [dissertação]. [Lisboa (Portugal)]: Universidade de Lisboa. 2009; 81p.

¹¹⁷ Moraes CCG, Kuroda RBS, Pinho APB, Ywasaki F, Meneses AMC, Martins IV, et al. Pesquisa de anticorpos para sorovares de *Leptospira interrogans* patogênicas em equídeos criados na ilha de Algodoal, Estado do Pará. Revista de Ciências Agrárias. 2010; 53 (2), 188-194p.

¹¹⁸ Rubel D, Seijo DA, Cernigoi B, Viale A, Wisnivesky-Colli C. *Leptospira interrogans* en una población canina del Gran Buenos Aires: variables asociadas con la seropositividad. Revista Panamericana de Salud Publica. 1997; 2 (2), 102-105p.

¹¹⁹ Souza Junior MF, Lobato ZIP, Lobato FCF, Moreira EC, Oliveira RR, Leite GG, et al. Presença de anticorpos da classe IgM de *Leptospira interrogans* em animais silvestres do

Estado do Tocantins, 2002. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2006; 39 (3), 292-294p.

¹²⁰ Pimentel JS, Solange M, Gennari SM, Dubey JP, Marvulo MFV, Vasconcellos AS, et al. Inquérito sorológico para toxoplasmose e leptospirose em mamíferos selvagens neotropicais do Zoológico de Aracaju, Sergipe. Pesquisa Veterinária Brasileira. 2009; 29 (12), 1009-1014p.

¹²¹ Marchiori Filho M, Girio RJS, Lui JF, Mathias LA, Brasil ATR. Estudo sorológico para leptospirose em populações de diferentes grupos genéticos de javalis (*Sus scrofa scrofa*, Linnaeus, 1758) dos estados de São Paulo e Paraná. Arquivos do Instituto Biológico. 2002; 69 (3), 9-15p.

¹²² De Paula CD. Dinâmica populacional da leptospirose em capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) de vida livre. [dissertação]. [São Paulo (SP)]: Universidade de São Paulo; 2003. 130p.

¹²³ Shimabukuro JS. Estudo da soroprevalência de *Leptospira* spp. Em capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) na bacia hidrográfica do Alto Tietê, SP. [dissertação]. [São Paulo (SP)]. Universidade de São Paulo. 2006; 50p.

¹²⁴ Vinetz JM. Leptospirosis. Current Opinion in Infectious Diseases. 2001; 14, 527-538p.

¹²⁵ Furtado LRI, Avila M.O, Fehlberg MFB, Teixeira M.M, Rosado RLI, Martins LFS, et al. Prevalência e avaliação de fatores de risco a leptospirose canina, no município de Pelotas-RS. Arquivos do Instituto Biológico. 1997; 64 (1), 57-61p.

¹²⁶ McDonough PL. Leptospirosis in Dogs - Current Status. In: Morales AJR. Recent Advances in Canine Infectious Diseases. New York (USA): International Veterinary Information Service Ithaca; 2012. 43-50p.

¹²⁷ Almeida LP, Martins LFS, Brod CS, Germano ML. Levantamento soropidemiológico de leptospirose em trabalhadores do serviço de saneamento ambiental em localidade urbana da região sul do Brasil. Revista Saúde Pública 1994; 28 (1), 76-81p.

¹²⁸ Muller CBA utilização de meios alternativos de solução de conflitos em processos de territorialização: casos de Alcântara e Marambaia. Cadernos de debates Nova Cartografia Social: Territórios quilombolas e conflitos. Manaus. 2010; 1 (2); 89-101p.

¹²⁹ Costa F. Estudos ecológicos sobre reservatórios urbanos de leptospirose em Salvador. [Tese]. [Salvador (BA)]: Fundação Oswaldo Cruz; 2010; 116p.

¹³⁰ Alcayaga EL, Lovatto P, Voss JG, Silva M, Taus S. Educação ambiental em saúde pública: mitigação da leptospirose humana e animal nos municípios que integram a bacia hidrográfica do Rio Pardo, RS, Brasil. Caderno de Pesquisa. 2007; 20 (2), 5-16p.

¹³¹ Viegas SARA, Caldas EM, Oliveira EMD. Aglutininas anti-leptospira em hemossoro de animais domésticos de diferentes espécies, no Estado da Bahia, 1997/1999. Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal. 2005; 1 (1-6), 6p.

¹³² Confalonieri UEC, Chame M, Najar A, Chaves SAM, Krug T, Nobre C, et al. Mudança global e desenvolvimento: importância para saúde. Informe Epidemiológico do SUS, Brasília, DF. 2002; 11 (3), 139-154p.

¹³³ Mattos CCLV. Caracterização climática da Restinga da Marambaia. In: Menezes LT, Peixoto, AL, Araújo DSD. Historia natural da Marambaia. Seropédica: EDUR- UFRRJ. 2005; 55- 66p.

¹³⁴ Ward MP, LT Glickman , Guptill LE. Prevalence of and risk factors for leptospirosis among dogs in the United States and Canada: 677 cases (1970-1998). Journal of American Veterinary Medical Association. 2002; 220 (1), 53-58p.

¹³⁵ Leighton F, Kuiken T. Leptospirosis. In: Williams ES, Barker IK. Infectious diseases of wild mammals. 3. ed. Iowa: Iowa State University Press; 2001, p.498-502.