

LEVANTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO DA LEPTOSPIROSE CANINA EM ANIMAIS ATENDIDOS NO HOSPITAL VETERINÁRIO DA UNIME NA CIDADE DE LAURO DE FREITAS – BAHIA

William James de Santana ⁽¹⁾, Aline de Souza Santos⁽¹⁾, Zander Fernandes Teixeira de Azevedo⁽¹⁾, Júlio de Oliveira Macedo⁽¹⁾, Manuela Solcá⁽²⁾, Paulo Camaroti⁽²⁾, Mariana Tourinho⁽²⁾, Débora Bittencourt Mothe Fraga⁽³⁾, Robson Bahia Cerqueira⁽⁴⁾, Flavia Weykamp da Cruz McBride⁽⁵⁾

RESUMO

A leptospirose é uma importante antropozoonose de distribuição cosmopolita e considerada, atualmente, uma infecção emergente. Roedores, pequenos carnívoros e animais domésticos são reservatórios conhecidos dessa enfermidade. O cão, por ter um contato direto com o homem, representa um elo de transmissão entre o ser humano e o rato – portador sadio universal – principalmente em países tropicais. Áreas urbanas periféricas cujas condições sanitárias e de infra-estrutura são precárias constituem-se em zonas de risco de contaminação de animais e do homem. Entretanto, o diagnóstico deve ser confirmado baseando-se nos resultados de testes sorológicos como ensaio imunoenzimático e microaglutinação em tubo (ELISA e MAT respectivamente). A investigação foi realizada com questionamento de idade, sexo, raça, vacinação, histórico clínico e fatores de risco como presença de roedores, acúmulo de lixo, ausência de rede de esgoto e presença de animais silvestres. O aspecto clínico do animal também foi investigado através de exame físico como aferição da temperatura, peso, coloração da mucosa ocular e das gengivas e presença de icterícia, tempo de preenchimento capilar, presença de dor abdominal e linfadenopatia. A análise das amostras sanguíneas foi realizada através da microaglutinação em tubo. Este trabalho teve como objetivo identificar através da aplicação de um questionário aspectos epidemiológicos da leptospirose canina em animais atendidos no Hospital veterinário da UNIME, Lauro de Freitas, Bahia.

(1) Acadêmico de Medicina Veterinária da UFBA

(2) Acadêmico de medicina Veterinária da UNIME

(3) Professora Parasitologia da UFBA

(4) Professor de Doenças Infecciosas da UNIME

(5) Professora de Microbiologia da UFBA

INTRODUÇÃO

De acordo com HORSCH (1988); LEFBVRE (2003), as leptospiros são espiroquetas da família *Treponemataceae* e da ordem dos *Spirochaetales*, são Gram negativas, em formato de S ou C, móveis, apresentando mais de 212 sorovares(sv), agrupados em 23 sorogrupos. A Leptospirose é uma enfermidade comum nos animais de estimação, produção ou silvestres – que podem ser fonte de infecção para humanos (Zuerner *et al.*, 1995) ,causada por bactérias classificadas em duas principais espécies: as Leptospiras patogênicas, membros da espécie *L. interrogans* e as *L. biflexa*, cepas saprófitas de vida livre no ambiente. Roedores, pequenos carnívoros, animais domésticos e errantes são reservatórios conhecidos dessa enfermidade. De acordo com Caldas *et al.*, (1997), o cão, como pode ser infectado, com frequência, pelo agente da leptospirose, é considerado reservatório assintomático, representando desta forma um elo de transmissão entre o ser humano e o rato – portador sadio universal – principalmente em países tropicais. Em consequência disso, eles constituem uma fonte perene de infecção tanto para outras espécies de animais como para o homem (Santa Rosa *et al.*, 1980). Áreas urbanas periféricas cujas condições sanitárias e de infra-estrutura são precárias constituem-se em zonas de risco de contaminação de animais e do homem. A transmissão ocorre através do contato com água e alimentos contaminados pela urina, fetos abortados e corrimentos uterinos de um animal infectado. Pode ocorrer também durante o cruzamento, onde o microrganismo no período de leptospiremia está contido no sêmen, tornando possível a disseminação venérea. A invasão do tecido cutâneo pela leptospira ocorre através das mucosas, de lesões ou pela pele intacta, porém, sensibilizada por contato prolongado com fontes de infecção como água e urina. As leptospiros alcançam a corrente sanguínea e órgãos parenquimatosos no 8º dia da infecção. Esta se constitui na fase septicêmica, onde ocorre a indução da produção dos anticorpos que auxilia na destruição das leptospiros, constituindo assim, a fase tóxica da doença. Caso ocorra a sobrevivência dos microrganismos pela resposta imunológica, podem alojar-se em órgãos de tropismo como túbulos renais, útero, olhos e meninges

(HORSCH, 1988; QUINN *et al.*, 2005). No homem e nos animais a doença pode ser assintomática ou até mesmo grave, podendo ser fatal caso haja insuficiência renal ou hepática (AIELLO; MAYS, 2001). Os animais com leptospirose podem apresentar sinais clínicos inespecíficos como vômito, letargia e anorexia, podendo levar a falsos diagnósticos de dengue, hepatite viral, dentre outros. Por outro lado, a presença de sinais como olhos congestionados, dor abdominal, uremia, trombocitopenia e icterícia, associados a um histórico apropriado sugere um diagnóstico de leptospirose. Este trabalho teve como objetivo identificar através da aplicação de um questionário aspectos epidemiológicos da leptospirose canina em animais atendidos no Hospital veterinário da UNIME (HOSVET), em Lauro de Freitas, Bahia.

MATERIAL E MÉTODO

Amostras

O estudo foi conduzido no HOSVET situado no município de Lauro de Freitas, Bahia, no período de 2007 a 2008. A amostragem foi realizada de forma aleatória e independentemente do quadro clínico do animal. O sangue foi obtido assepticamente por venopunção da jugular ou cefálica após contenção adequada do animal, utilizando-se seringas de 5 ml. Em seguida, o sangue foi colocado em tubos identificados e transportados em recipiente isotérmico até o Laboratório de Doenças Infecciosas (LADI)-HOSVET, o qual foi centrifugado por 20 a 30 minutos a 4000 RPM para obtenção do soro. Todas as 23 amostras foram armazenadas sob refrigeração a -20 °C até o momento das provas sorológicas. Os proprietários dos animais responderam a um questionário padronizado e previamente codificado para investigar idade, sexo, raça, vacinação, histórico clínico e fatores de risco como presença de roedores, episódios de enchentes, acúmulo de lixo e ausência de rede de esgoto. O aspecto clínico do animal também foi avaliado através de exame físico como aferição da temperatura, peso, coloração da mucosa ocular e das gengivas, tempo de preenchimento capilar, presença de dor abdominal e linfadenopatia. Os dados obtidos foram inseridos no programa EpiInfo 3.4.3 para posterior análise das frequências.

Microaglutinação em Tubo (MAT)

Utilizou-se a prova de microaglutinação (MAT) em microscópio de campo escuro com antígenos vivos no 8º dia de cultivo e conservada em meio Fletcher, constituída de 18 sorovares de *Leptospira* spp., a saber: *Andamana* (saprófita), *Australis*, *Autumnalis*, *Canicola*, *Cynopteri*, *Grippothyfosa*, *Hebdomadis*, *Javanica*, *Panamá*, *Pomona*, *Pyrogenes*, *Wolffi*, *Shermani*, *Catellonis*, *Tarassovi*, *Hardjo*, *Copenhageni* (L1 130) e (C-1604-01). Para a realização da triagem e da titulação, as linhagens foram, inicialmente, cultivadas em meio de Fletcher (semi-sólido) e, em seguida, mantidas por repiques semanais em meio de Ellinghausen (EMJH). As linhagens das leptospiros foram fornecidas pelo Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz (CPqGM) – FioCruz. A cepa L1 130 foi isolada de um paciente humano no Hospital Colto Maia num surto de leptospirose que acometeu Salvador em 1996. Já a cepa (C-1604-01) foi isolada de um canino no bairro de Pau da Lima, Salvador. A bateria de cepa de leptospiros utilizadas nessa pesquisa está detalhada na tabela 1.

Tabela 1: Demonstração das variantes sorológicas.

Sorogrupo	Variante do sorogrupo
<i>Australis</i>	<i>australis</i>
<i>Autumnalis</i>	<i>autumnalis</i>
<i>Ballum</i>	<i>castellonis</i>
<i>Canicola</i>	<i>canicola</i>
<i>Cynopteri</i>	<i>cynopteri</i>
<i>Grippothyphosa</i>	<i>grippotyphosa</i>
<i>Hebdomadis</i>	<i>hebdomadis</i>
<i>Icterohaemorrhagiae</i>	<i>copenhageni</i> (C-1604-01)
<i>Icterohaemorrhagiae</i>	<i>copenhageni</i> (L1 130)
<i>Javanica</i>	<i>javanica</i>
<i>Panamá</i>	<i>panama</i>
<i>Pomona</i>	<i>pomona</i>
<i>Pyrogenes</i>	<i>pyrogenes</i>
<i>Sejroe</i>	<i>hardjo</i> (<i>hardjopragitna</i>)
<i>Sejroe</i>	<i>wolffi</i>
<i>Shermani</i>	<i>shermani</i>
<i>Tarassovi</i>	<i>tarassovi</i>
<i>Andamana</i>	<i>andamana</i>

Triagem

A triagem foi realizada com os 23 soros, utilizando uma bateria de 18 sorovares como antígenos. Após o cultivo dos antígenos em meio EMJH por 8 dias em estufa a 30°C, eram removidos 0,2ml de cada antígeno e adicionado a 0,2ml do soro diluído em solução salina em uma proporção de 1:25, 1:50 e 1:100. Esse procedimento foi realizado com cada soro no qual se testava a aglutinação para os diferentes sorovares. Em seguida, as misturas de soro e antígeno eram encaminhadas à estufa de 37°C durante 3 (três) horas e posteriormente eram realizadas as leituras através da microaglutinação (MAT) em campo escuro. Os soros que apresentaram reação positiva para um determinado sorovar foram novamente congelados para posterior utilização na titulação juntamente como o sorovar reagente.

Titulação

A titulação foi realizada com as 11 amostras selecionadas da triagem. Os soros sofreram um diluição de 1:50 em solução salina na quantidade de 4,9 ml de solução salina para 0,1 ml do soro. Em seguida, foi removido da diluição 0,2 ml com uma micropipeta e colocado em um eppendorf que recebeu a identificação do título de **100** e mais 0,2 ml do antígeno foi adicionado nesse mesmo eppendorf. Um segundo eppendorf, identificado com a numeração do título de **200**, recebeu 0,2 ml da mistura do 1º eppendorf e mais 0,2 ml do antígeno. No 3º eppendorf com a identificação do título de **400**, recebeu 0,2 ml do 2º eppendorf mais 0,2 ml do antígeno. O 4º eppendorf com a identificação do título de **800**, recebeu 0,2 ml da diluição do 3º eppendorf e mais 0,2 ml do antígeno. O 5º eppendorf representando uma titulação de **1600** recebeu 0,2 ml do antígeno e mais 0,2 ml da diluição do 4º eppendorf. Seguiram-se estes procedimentos, aumentando-se a titulação, enquanto fossem obtidos resultados positivos na diluição anterior. Todo o procedimento foi realizado em todos os soros separadamente, utilizando os sorovares que havia sido positivo para determinado soro no teste de triagem. Para a realização da leitura da aglutinação, foram removidos 10 µl de cada eppendorf e postos em lâminas e

encaminhadas à microscopia em campo escuro para a realização da titulação. Os soros foram titulados de acordo com a última titulação observada ao microscópio e apenas aqueles que atingiram uma titulação igual ou maior auq 1:100 foram considerados reagentes.

RESULTADOS

Das 23 amostras submetidas ao teste de microaglutinação 10 (43,5%) foram consideradas reagentes sendo que 5 (21,7%) foram reagentes para o sorovar *copenhageni* (L1 130), 3 (13%) para cada um dos seguintes sorovares: *copenhageni* (C-1604-01), *castellonis*, *cynopteri* e *grippothyphosa* e 1 (4,3%) para cada um dos sorovares: *pomona*, *australlis* e *autumnalis*; 5 animais reagiram para 2 ou mais sorovares. Dos 10 animais reagentes, 3 (30%) foram machos e 7 (70%), fêmeas. A idade variou de 3 a 10 anos, sendo que 2 animais tinham 4 e 8 meses cada. Entre os reagentes, 9 são exemplares puros das raças: fila, cocker spainel, boxer, akita, labrador, rottweiler; apenas um animal é sem raça definida (SRD). Os animais que apresentaram maior titulação foram os de raça definida: dois akitas (um com 1:200 para *cynopteri* e outro com 1:1600 para o mesmo sorovar e 1:100 para os sorovares *autumnalis* e *grippothyphosa*). O boxer com 1:200 para L1 130, um cocker com 1:200 para L1 130 e para C-1604-01, o rottweiler com 1:200 para L1 130 e o maior destaque para o labrador de 4 meses com 1:3200 para L1 130 e 1:6400 para C-1604-01 que havia sido vacinado 2 meses antes da coleta sanguínea.

Tabela 2: Sorovares Detectados na Microaglutinação

SOROVARES	POSITIVOS	NEGATIVOS
<i>copenhageni</i> (L1 130)	05 (21,7%)	18 (78,3%)
<i>copenhageni</i> (C-1604-01)	03 (13%)	20 (87%)
<i>castellonis</i>	03 (13%)	20 (87%)
<i>cynopteri</i>	03 (13%)	20 (87%)
<i>grippothyphosa</i>	03 (13%)	20 (87%)
<i>pomona</i>	01 (4,3%)	22 (95,7%)
<i>australlis</i>	01 (4,3%)	22 (95,7%)
<i>autumnalis</i>	01 (4,3%)	22 (95,7%)

De acordo com as respostas fornecidas pelos proprietários, dos animais reagentes, apenas 4 (40%) alegaram a presença de ratos nas proximidades da residência e 6 (60%) a ausência do roedor. Com relação às tocas ou ninhos desses animais 7 (70%) notaram a sua presença e 3 (30%) não. Avaliando à presença dos roedores e tocas: 3 (30%) dos proprietários notaram a presença de ambos nas residências e 2 (20%) proprietários desses animais reagentes não notaram nem a presença dos roedores nem de tocas. Com relação à vacinação dos animais considerados reagentes, apenas 1 proprietário não soube dizer se o cão era vacinado, 1 alegou nunca ter vacinado o seu animal e 8 disseram que vacinaram, sendo as vacinas procedentes de clínicas veterinárias, caracterizando uma maior validação dessa vacinação. Desses 8 animais, apenas 2 apresentavam pouco tempo (2 meses) entre a vacinação e a coleta do sangue, sendo que destes encontra-se aquele que apresentou maior título, já citado anteriormente. Os demais já possuíam de 4 a 6 meses de vacinação, sendo alguns chegando a mais de 1 ano. Quanto a presença de vegetação 5 (50%) informaram a sua presença na residência ou próxima a ela e os outros 5 a sua ausência. Quanto à presença do sariguê (*Didelphis albiventris*), apenas 3 (30%) proprietários alegam a presença do animal na propriedade ou próximo a ela; os outros 7 (70%) informaram que nunca viram tais animais na região peridomiciliar. Dos 10 animais reagentes, 30% (3) bebiam água de outros locais (piscina e mar) que não o seu bebedouro, considerando que esta água está mais susceptível a contaminações. Quanto ao saneamento básico, 1 (10%) informou que havia na região esgoto a céu aberto e 9 (90%) alegaram não haver. Quanto aos sinais clínicos, apenas 1 apresentou um dos sinais característicos da doença: icterícia, que se mostrou leve e somente na mucosa ocular. Quanto à queixa principal desses animais, motivo pelo qual foram atendidos pelo hospital, apenas 1 demonstrou sinais pertinentes à leptospirose: distúrbios no trato genito-urinário, os 9 demais (90%) apresentaram sinais inespecíficos como apatia, inapetência, emagrecimento, diarreia, problemas dermatológicos anorexia e problemas auriculares.

Tabela 3: Resultado do questionário epidemiológico aplicado aos reagentes em número de animais

	ROEDOR	TOCAS	VACINAÇÃO	VEGETAÇÃO	SARIGUÊ	BEBER ÁGUA*	ESGOTO
Sim	04	07	08	05	03	03	01
Não	06	03	01	05	07	07	09
Não Sabe	00	00	01	00	00	00	00
TOTAL	10	10	10	10	10	10	10

* Animais que bebem água de outras fontes como piscina e mar

Os outros 13 (56,5%) animais foram consideradas não-reagentes e destes, 61,5% (8) são machos e 5 (38,5%) fêmeas. Desses animais, 6 (45,2%) não tinham raça definida e 7 (54,8%) eram exemplares puros. A tabela 4 a seguir indica o resultado da inquirição dos proprietários quanto aos seguintes dados: roedores, tocas de roedores, vacinação, vegetação, lixo, sariguê, beber água de outras fontes, esgoto a céu aberto e icterícia.

Tabela 4: Resultado do questionário dos animais não-reagentes

	ROEDOR	TOCAS	VACINAÇÃO	VEGETAÇÃO	LIXO	SARIGUÊ	BEBER ÁGUA*	ESGOTO	ICTERÍCIA
Sim	07	11	08	09	04	04	01	01	01**
Não	05	01	05	03	08	07	12	11	11
Não Sabe	01	01	00	01	01	02	00	01	01
TOTAL	13	13	13	13	13	13	13	13	13

* Animais que bebem água de outras fontes como piscina

** Um caso de icterícia severa

Dentre os sinais clínicos presentes, os 13 animais apresentaram sinais inespecíficos, não característicos para a doença, como: vômito, inapetência, apatia, emagrecimento, rinorragia, aborto, porém 3 desses animais apresentaram distúrbios do trato genito-urinário como anúria, hematúria e um com suspeita de leptospirose, porém, todos os 13 não-reagentes no teste de microaglutinação.

DISCUSSÃO

Os cães errantes e domésticos podem, pelo seu estreito convívio com o homem, servir de importante fonte de infecção, participando na epidemiologia da doença (GENOVEZ,1996; FARRINGTON & SULZER, 1982). Diferentes estudos sobre pesquisa de aglutininas específicas no soro de animais, com a finalidade de demonstrar o contato dos cães com a bactéria, relatam freqüências muito variáveis (AVILA *et al.*, 1998). No presente trabalho, observou-se que o sorovar mais freqüente foi o *copenhageni* (L1 130), ratificando a afirmação de BROWN *et al.* (1996) de que a ocorrência dos sorotipos *L. canicola* e *L. icterohaemorrhagiae* vem decrescendo, sendo que nenhum animal reagiu para o sorovar *canicola*. AVILA *et al.* (1998), relata que o ambiente físico, biológico e econômico-social influenciam a ocorrência de leptospirose. A água, considerada o fator ambiental mais importante na manutenção da leptospira (ANDRE-FONTAINE; GANIERE, 1990), segundo SZYFRES (1976), WEEKES; EVERARD; LEVETT (1997), uma vez contaminada com a urina de animais infectados constitui um elemento bastante significativo na transmissão da leptospirose. Apesar desses dados, nosso estudo não encontrou relação significativa entre o hábito de os animais beberem água de fontes possivelmente contaminadas e a infecção por leptospira. Quanto à presença de roedores, avaliada pelo questionário, não encontramos relação entre a mesma e a infecção dos cães. Entretanto, a prevalência do sorovar *copenhageni* aponta a importância da população de roedores na transmissão da doença (BATISTA *et al.*, 2005), o que reforça a necessidade de controle de roedores. Em geral, nosso estudo não encontrou relação positiva entre as variáveis epidemiológicas analisadas com a freqüência de infecção, o que pode ser justificado pelo fato de que as respostas dos proprietários não são inteiramente confiáveis, pois os mesmos podem esquecer ou mesmo ocultar fatos que consideram indesejáveis (como presença de roedores em casa), o que torna muitas vezes inconclusivas as informações obtidas nos questionários.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos servem como um alerta em relação ao potencial zoonótico da leptospirose canina. Apesar de não podermos observar a relação entre a presença dos fatores de risco e a infecção dos animais, é imprescindível o cuidado contra a exposição dos proprietários e comunicantes dos cães a alguns dos mesmos fatores de risco a que estiveram expostos os cães. A maior prevalência do sorovar *copenhageni* indica a importância de roedores como transmissores da leptospirose, o que reforça a necessidade de programas de controle e educação em saúde.

Referências

AIELLO, S. E.; MAYS, A. **Manual Merck**. 8ª ed. São Paulo: Roca, p. 388-389, 2001.

ANDRE-FONTAINE, G.; GANIERE, J. P. **New topics on leptospirosis**. Comparative Immunology, Microbiology And Infectious Diseases , Oxford, v.13, n.3, p.163-168, 1990.

ÁVILA, M.O.; FURTADO, L.R.I.; TEXEIRA, M.M. et al. **Agglutininas anti-leptospira em cães na área de influência do Centro de Controle de Zoonoses, Pelotas, RS, Brasil, no ano de 1995**. *Ciênc. Rural*, v.28, p.107-110, 1998.

BATISTA, C.S.A.; ALVES, C.J.; AZEVEDO, S.S.; VASCONCELLOS, S.A.; MORAIS, Z.M.; CLEMENTINO, I.J.; ALVES, F.A.L.; LIMA, F.S.; ARAÚJO NETO, J.O. **Soroprevalência e fatores de risco para a leptospirose em cães de Campina Grande, Paraíba**. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, supl. 2, p.179-185, 2005.

BROWN, C.A.; ROBERTS, A. W. et al. **Leptospira interrogans serovar grippotuphosa infection in: dogs**. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, n. 7, p. 1265-1267, 1996.

CALDAS, E.M.; DORIA, J.D.; MARTINS, M.A. **Imunological inquiry for the epidemiology of leptospirosis in canis familiaris in Salvador, Bahia , Brazil**, *international journal of Zoonoses*, v.4, p.103-110,1997.

FARRINGTON, N.P.; SULZER, K.R. **Canine Leptospirosis in Puerto Rico**. *Int. J. Zoon.*,p.45-50, 1982.

GENOVEZ, M. E. **Leptospirose em cães**. *Pet. Vet.* v.1, n. 1, p. 6-9, março/abril, 1996.

HORSCH, F. Leptospirose. In: BEER, J. **Doenças Infecciosas em animais domésticos**. São Paulo: ROCA, p. 305-309, 1988.

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

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, N. J. LEONARD, F. C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Artemed, p. 179-183, 2005

SANTA ROSA, C.A.;SULZER, C.R.;YANAGUITA,R.M.;DA SILVA,A.S.
Leptospiroses in wildlife in Brazil: isolation of serovars canicola, pyrogenes and grippotyphosa. *Internetonal journal of Zoonoses*. v.7, p.40-43,1980

SZYFRES, S. **Leptospirosis en América Latina y el Caribe**. In REUNION INTERAMERICANA SOBRE EL CONTROL DE LA FIEBRE AFTOSA Y OTRAS ZONOSSES, 8., 1976, Washington. Anais... Washington: Organizacion Panamericana de la Salud, 1976. p.124-141.

WEEKES, C. C.; EVERARD, C. O. R.; LEVETT, P. N. **Seroepidemiology of canine leptospirosis on the island of Barbados**. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v.51, p.215-212, 1997.

ZUERNER, R.L.; ALT, D.; BOLIN, C. A. **IS1533-Based PCR assay for indentification of *Leptospira interrogans sensu lato* serovars**. *Journal of Clinical Microbiology*, v.33, n.12, p.3284-3289,1995.