

PESQUISA DE ANTICORPOS E DNA DE *Leptospira* spp. EM SORO CANINO

Helio Langoni¹
Maíra Claudio de Ponte¹
Daniela Barbosa¹
Marcela de Pinho Manzi¹
Rodrigo Costa da Silva¹
Benedito Donizete Menozzi¹

RESUMO

A leptospirose é uma antropozoonose causada por diferentes sorotipos de leptospiras cuja epidemiologia está associada a altos índices pluviométricos, com alta ocorrência em animais de companhia, de interesse zootécnico e espécies silvestres. Os cães tem estreita relação com humanos e pela infecção renal podem eliminar a bactéria pela urina, sendo importante fonte de infecção. O presente estudo objetivou a determinação da soroprevalência e a carga bacteriana de *Leptospira* spp. em 151 cães de um Centro de Controle de Zoonoses. Foram coletadas amostras de sangue para a obtenção de soro e realização da prova de Soroaglutinação Microscópica (SAM). 59/151 (39,1%) dos animais foram sororreagentes para pelo menos um sorovar sendo os de maior prevalência e com títulos mais elevados o sorovar *Copenhageni* (23,73%) pertencente ao sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* e o sorovar *Icterohaemorrhagiae* (16,95%). O sorovar *Canicola*, comumente encontrado nos cães, apresentou 10,17% de sororeatividade com títulos menores. As amostras de soro foram também submetidas a pesquisa de DNA da bactéria pela reação em cadeia pela polimerase convencional (cPCR) utilizando-se os primers Lep1 e Lep2 e apenas uma amostra foi positiva sendo submetida a PCR quantitativa (qPCR), que resultou numa carga bacteriana de 14.829.820/mL. Os resultados demonstram evidência de infecção por *Leptospira* spp. em cães, com níveis de anticorpos detectáveis à SAM, e que em um cão foi possível detectar a bactéria no soro sanguíneo. Destaca-se, portanto, a dispersão de diferentes sorovares de *Leptospira* spp. no ambiente, devido à eliminação destes sorovares por animais portadores renais, bem como o risco de transmissão para outros animais e humanos e a importância dos cães como animais sentinelas nos estudos epidemiológicos.

Palavras-chave: leptospira, cães, anticorpos, DNA bacteriano.

ANTIBODIES AND DNA DETECTION OF *Leptospira* spp. IN CANINE SERUM**ABSTRACT**

Leptospirosis is a anthropozoonosis caused by different serotypes of leptospira whose epidemiology is associated with heavy rainfall, with high occurrence in pets, animals of zootechnical interest and wild species. Dogs have close relationship with humans and in the kidney infection can eliminate the bacteria in the urine, being an important source of infection. The present study aimed to determine the prevalence of antibodies and bacterial load of *Leptospira* spp. in 151 dogs received at a Center for Zoonosis Control. Blood samples were collected to obtain serum which was submitted to the Microscopic Agglutination Test (MAT). 59/151 (39.1%) dogs were seropositive for at least one serovar with the highest prevalence and higher titers for the serovar *Copenhageni* (23.73%) serogroup

¹ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Laboratório de Diagnóstico de Zoonoses, DHVSP-FMVZ-UNESP – Botucatu. Contato principal para correspondência

Icterohaemorrhagiae and to serovar *Icterohaemorrhagiae* (16.95%). The Canicola serovar, commonly found in dogs, showed 10.17% of seroreactivity with smaller titles. Serum samples were also examined for the presence of DNA of the bacterium by the conventional Polymerase Chain Reaction (cPCR) using the primers Lep1 and Lep2 and only one sample was positive, being subjected to quantitative PCR (qPCR), resulting in bacterial load of 14.829.820/mL. The results show evidence of infection with *Leptospira* spp. in dogs, with detectable levels of antibodies by MAT, and in one dog the bacteria could be detected in the blood serum. It is noteworthy, therefore, the environment dispersion of different serovars of *Leptospira* spp., due to the elimination of these serovars by carrier animals kidney, and the risk of transmission to other animals and humans and the importance of dogs as sentinel animals in epidemiological studies.

Keywords: leptospira, dogs, antibodies, bacterial DNA.

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS Y ADN DE *Leptospira* spp. EN SUERO CANINO

RESUMEN

La leptospirosis es una antropozoonosis causada por diferentes serotipos de leptospira cuya epidemiología se asocia con alta precipitación, con una alta incidencia en los animales domésticos, de interés zootécnico y las especies silvestres. Los perros tienen una estrecha relación con los seres humanos y la infección renal puede eliminar las bacterias en la orina, una importante fuente de infección. El presente estudio tuvo como objetivo determinar la prevalencia de anticuerpos y la carga bacteriana de *Leptospira* spp. en 151 perros recibidos en un Centro de Control de Zoonosis. Se recogieron muestras de sangre para obtener suero y la realización de la Prueba de Aglutinación Microscópica (MAT). 59/151 (39,1%) de los perros eran seropositivos a al menos un serovar, con mayor prevalencia y títulos mayores para el serovar *Copenhageni* (23,73%) del serogrupo *icterohaemorrhagiae* (16,95%). El serovar canicola, que se encuentra comúnmente en perros, mostró 10,17% de seroreactividad con títulos menores. También se examinaron muestras de suero para detectar la presencia de ADN de la bacteria por la reacción en cadena de la polimerasa convencional (cPCR) utilizando los cebadores LEP1 y LEP2 y sólo una muestra fue positiva, siendo sometida a PCR cuantitativa (qPCR), lo que resultó en un cargo bacteriano 14.829.820/mL. Los resultados muestran evidencia de infección con *Leptospira* spp. en perros, con niveles detectables de anticuerpos MAT y que en un perro podría detectar bacterias en el suero sanguíneo. Es de destacar, por lo tanto, la dispersión de diferentes serovares de *Leptospira* spp. para el medio ambiente, debido a la eliminación de estos serovares por animales portadores renales, así como el riesgo de transmisión a otros animales y seres humanos y la importancia de los perros como animales centinelas en los estudios epidemiológicos.

Palabras clave: leptospira, perros, anticuerpos, ADN bacteriano.

INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose bacteriana aguda ou crônica de grande polimorfismo clínico que afeta diversas espécies animais, entre elas os caninos, e humanos. Seu agente etiológico é a *Leptospira interrogans*, com mais de 250 sorotipos.

Os animais domésticos e silvestres podem se tornar portadores e contribuir para a disseminação das leptospirosas no ambiente. Humanos se infectam direta ou indiretamente, respectivamente, por lesões na pele e mucosas ou por meio da água, solo e alimentos

contaminados com urina de animais portadores (1). Os roedores geralmente são portadores permanentes de diversos sorovares de leptospiros, portanto, os ambientes em que circulam estão constantemente contaminados (2).

Nos cães, a infecção pode variar de quadros assintomáticos a graves. A forma mais grave é a hemorragia que se instala repentinamente com febre por 3 a 4 dias, seguida por rigidez e mialgias nos membros posteriores, hemorragia na cavidade oral com tendência a formação de úlceras, necrose e faringite. Em etapa posterior pode haver gastroenterite hemorrágica e nefrite aguda. Tanto na leptospirose pelo sorovar *Canicola* como pelo *Icterohaemorrhagiae* pode haver icterícia (3).

O caráter zoonótico da enfermidade é dado pela transmissão da bactéria para humanos, principalmente, por meio da urina de roedores e também pelo contato com cães, que adquirem a doença pelo contato com outros cães ou roedores que urinam em áreas comuns. As áreas tropicais do globo são endêmicas, devido ao alto índice pluviométrico, sendo que os maiores registros de casos de leptospirose são nas estações chuvosas; havendo um agravamento em inundações, situações em que os roedores migram para os domicílios (3,4).

No Brasil, os achados sorológicos em cães indicam a soroprevalência de diferentes sorovares, como *Icterohaemorrhagiae*, *Copenhageni*, *Canicola*, *Pyrogenes*, *Hardjo*, *Castellonis* e *Ballum* entre outros, variando as porcentagens e importância entre os vários pesquisadores e regiões (1,4-8).

O teste de Soroaglutinação Microscópica (SAM) é considerado pela Organização Mundial da Saúde como o método de eleição para diagnóstico sorológico da leptospirose, apresentando alta sensibilidade e especificidade, aliado a simples execução e precocidade dos resultados (9). As ferramentas moleculares têm contribuído para a avaliação epidemiológica da condição de infecção e contaminação ambiental, auxiliando na determinação de portadores renais. A detecção do DNA pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) é altamente sensível e permite um diagnóstico acurado. Perfis de detecção direcionados para leptospiros patogênicas são estudados atualmente, porém a utilização de *primers* gênero-específicos associado com provas sorológicas e a clínica permitem uma maior confiabilidade dos resultados, melhor interpretação e atividades de vigilância com vistas ao controle da disseminação da infecção (1).

Este estudo teve como objetivo determinar a soroprevalência de anticorpos e a presença de DNA de *Leptospira* spp. pela PCR e a carga bacteriana nas amostras de soro de cães recebidos em um Centro de Controle de Zoonoses buscando-se elucidar os aspectos de epidemiologia e de patogenia na infecção leptospírica.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e obtenção de amostras

Utilizou-se o programa Epi Info (10) para se determinar o cálculo do número de amostras (n). Considerando-se uma população humana de 344.039 habitantes no município, e uma proporção da população humana em relação a canina de 1:7 (11), estimou-se a população canina aproximada de 49.000 animais, e, como a prevalência em animais errantes na região era desconhecida, utilizou-se como referência uma prevalência esperada de infecção por *Leptospira* spp. De 50%, nível de significância (α) de 5%, nível de confiança de 95% e margem de erro de 8%, encontrando-se um n de 151 animais que foram avaliados sem predileção por sexo, raça ou idade. As amostras de sangue foram obtidas por punção da veia cefálica e centrifugadas a 1600xg por 10 minutos e o soro foi acondicionado em microtubos de 1,5 mL, identificados, e congelados a -20°C até o momento do uso.

Soroaglutinação microscópica (SAM)

A pesquisa de anticorpos para *Leptospira* spp. foi realizada de acordo com o Manual Técnico de Leptospirose, do Ministério da Saúde (12), utilizando-se 29 sorovares de *Leptospira* spp., como segue: *Australis*, *Bratislava*, *Autumnalis*, *Butembo*, *Castellonis*, *Bataviae*, *Canicola*, *Whitcombi*, *Cynopteri*, *Djasiman*, *Sentot*, *Gryppytyphosa*, *Hebdomadis*, *Copenhageni*, *Icterohaemorrhagiae*, *Javanica*, *Panama*, *Pomona*, *Pyrogenes*, *Hardjo Prajitno*, *Hardjo Miniswajezak*, *Hardjo C.T.G.*, *Hardjo Bovis*, *Wolffi*, *Shermani*, *Tarassovi*, *Andamana* e *Patoc*. Cada amostra de soro foi diluída inicialmente a 1:50, considerando-se como reação positiva quando 50% ou mais de leptospiros estavam aglutinadas, pesquisando-se o título final até a diluição onde ocorreu 50% ou mais de aglutinação de leptospiros, considerando-se como positivas a partir do título 100/UI.

Diagnóstico molecular – Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada nas 151 amostras de soro, positivas e negativas para anticorpo anti-*Leptospira* spp., para expor o DNA bacteriano. A extração e purificação foi realizada utilizando-se kit de extração Illustra blood genomic Prep Mini spin kit (GE Healthcare Life Sciences do Brasil Ltda.[®]), com algumas alterações, conforme instrução do fabricante, e avaliado em espectrofotômetro.

Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

O DNA de *Leptospira* spp. foi amplificado pelos *primers* Lep1 (5'-GGCGGCGCGTCTTAAACATG-3') e Lep2 (5'-TTCCCCCATTGAGCAAGATT-3'), desenhados para o gene 16S ribossomal RNA de *Leptospira interrogans* (GenBank [X17547.1]), que amplifica um região com 330 pares de bases (bp), como descrito por Mérien et al. (13). Utilizou-se 25 µL contendo 1X tampão de PCR (10 mM Tris HCl pH 8.0, 50 mM KCl), 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 10 pmol de cada primer, 10 ng DNA purificado, e 0,2 U.µL⁻¹ de Platinum *Taq* DNA polimerase.

Utilizando-se termociclador Mastercycler ep 432 gradient (Eppendorf, USA) e o seguinte protocolo: denaturação inicial de 94° C por 3 min, seguido de 30 ciclos a 94° C por 1 min, 63° C por 1 min e 30s, e uma extensão final de 72° C por 2 min. Os produtos de PCR foram aplicados em um gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio, e submetido à eletroforese em tampão TBE (0,09 M Tris-HCl, 0,09 M ácido bórico, 2 mM EDTA, pH 8,3) por 60 min sob 80V (Electrophoresis Power Supply Model EPS 301; Life Technologies, EUA). Os fragmentos de amplificação foram visualizados em sistema GelDoc-It™ Imaging, utilizando-se o software VisionWorks® LS (UVP, EUA).

PCR quantitativa (qPCR): determinação da carga bacteriana

A única amostra de soro positiva na cPCR foi submetida à qPCR para a determinação da carga bacteriana utilizando-se os mesmos *primers* direcionados para a região alvo Lep1 e Lep2, amplificando um produto de 330 pb, utilizando o sistema SYBR Green, com as mesmas temperaturas e tempo de denaturação, pareamento e extensão. A reação foi processada e visualizada em equipamento de qPCR.

Análise dos dados

Os dados epidemiológicos e resultados da pesquisa de anticorpos para *Leptospira* spp. foram tabulados em planilha Excel. As associações entre as variáveis epidemiológicas e os resultados da sorologia foram analisadas pelos testes de Qui-quadrado ou Exato de Fisher, considerando-se nível de significância (α) de 5% (14). Todos os testes foram realizados em programa EpiInfoTM v.3.5.1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 151 animais, 59(35,1%) foram sororreagentes pelo menos para um sorovar. Os sorovares encontrados e as respectivas titulações encontram-se na Tabela 1. Os resultados das análises da associação dos dados epidemiológicos e animais sororreagentes na tabela 2. Na reação em cadeia da polimerase convencional (cPCR) apenas um animal foi positivo e na qPCR a única amostra de soro positiva apresentou carga bacteriana de 14.829.830 leptospiaras/mL.

Tabela 1. Soroprevalencia, sorovares e títulos de anticorpos para os respectivos sorovares de leptospiaras pela SAM. Botucatu, 2014.

Sorovares	N ^a	%	Títulos						
			100	200	400	800	1600	3200	6400
<i>Copenhageni</i>	14	23,73	4	4	4	1	2	-	-
<i>Djasiman</i>	11	18,64	7	4	-	-	-	-	-
<i>Icterohaemorrhagiae</i>	10	16,95	2	3	3	-	-	1	1
<i>Gryppotyphosa</i>	6	10,17	1	2	1	2	-	-	-
<i>Canicola</i>	6	10,17	4	-	2	-	-	-	-
<i>Australis</i>	3	5,08	1	2	-	-	-	-	-
<i>Bratislava</i>	2	3,39	1	-	-	1	-	-	-
<i>BTU</i> (Botucatu)	1	1,70	1	-	-	-	-	-	-
<i>Canicola + Djasiman</i> *	1	1,70	1	-	-	-	-	-	-
<i>Canicola + Gryppotyphosa</i> *	1	1,70	1	-	-	-	-	-	-
<i>Canicola + BTU</i> *	1	1,70	-	-	-	1	-	-	-
<i>Autumnalis + Djasiman</i> *	1	1,70	-	1	-	-	-	-	-
<i>Australis + Copenhageni</i> *	1	1,70	-	-	-	-	-	-	1
5 sorovares co-aglutinantes [†]	1	1,70	1	-	-	-	-	-	-
TOTAL	59	100,0	23	15	10	5	2	1	2

Legenda: ^aN número de animais reagentes; * Coaglutinação; [†]Sorovares Australis, Bratislava, Djasiman, Copenhageni, Icterohaemorrhagiae.

Um mesmo animal pode reagir para mais de um sorovar considerando-se como responsável pela infecção o de maior título, e como co-aglutinantes os demais sorovares reagentes. A grande maioria dos animais responderam ao sorovar *Copenhageni* (23,73%) do sorogrupo *Icterohaemorrhagiae*. Este sorovar é mantido por roedores sinantrópicos, com alta prevalência em cães e humanos nas grandes metrópoles brasileiras (15). O sorovar *Icterohaemorrhagiae* mostrou-se reagente em 16,95% dos animais, com títulos elevados em dois animais (Tabela 1). O sorovar *Canicola* foi encontrado em 10,17% das amostras com outros sorovares co-aglutinantes.

Leptospiras patogênicas dos sorogrupos *Icterohaemorrhagiae* e *Canicola* estão associadas à maioria dos casos clínicos de leptospirose em cães, embora a infecção por leptospiras por outros sorogrupos também tenha sido demonstrada por técnicas sorológicas (16). O sorovar *Djasiman* (18,64%) é um sorovar frequente em outros estudos (4-6). Encontrou-se co-aglutinação em seis animais para cinco sorovares. Na maioria das regiões tropicais, prevalece a infecção canina por leptospiras dos sorogrupos *Icterohaemorrhagiae* e *Canicola* (17).

Tabela 2. Associação entre variantes epidemiológicas e os resultados na SAM, para leptospirose. Botucatu, 2014.

Variáveis		N	SAM ^a	Variável (%); IC95% ^b	OR (IC95%) ^c	P ^d
Sexo	Macho	96	40	41,67; 32,30 – 51,69	1,35 (0,68 – 2,69)	0,25 ^e
	Fêmea	55	19	34,54; 23,36 – 47,81		
Idade	Até 1 ano	3	1	33,33; 6,76 – 80,59	-	0,67 ^f
	1 < n ≤ 5 anos	35	13	37,14; 23,14 – 53,78		
	5 < n ≤ 10 anos	55	25	45,45; 32,99 – 58,53		
	> 10 anos	58	20	34,48; 23,55 – 47,39		

Legenda: ^a Positivos para a pesquisa de anticorpos pela SAM quando título ≥ 100; ^b Frequência de reagentes baseada na variável estudada, com intervalo de confiança de 95%; ^c OR: *Odds ratio*; ^d P: valor de P para α = 5%; ^e Teste Exato de Fisher; ^f Teste de Qui-quadrado.

O sorovar com maior título foi o *Icterohaemorrhagiae*, sendo de 3200 UI em um animal e 6400 UI em outro. Os animais podem apresentar títulos variáveis e muitas vezes somente de contato com o agente, como 100 UI ou 200 UI, podendo significar somente infecção, e as vezes resíduo de anticorpo como resposta a vacinação. Títulos maiores podem indicar doença, e o animal pode tornar-se reservatório com eliminação do agente pela urina na fase de leptospirúria, contaminando o ambiente, e assim infectando outros animais e até humanos (3).

Não houve diferença significativa nas variáveis epidemiológicas como a idade, discordante de outros trabalhos (5). Com relação ao sexo, os machos apresentaram 1,35 vezes mais chance de infecção em relação às fêmeas, resultado similar aos encontrados por Batista et al. (18), onde os machos apresentaram 1.38 mais chances de se infectarem.

A única amostra de soro positiva na PCR convencional, revelou carga bacteriana na qPCR, de 14.829.830 leptospiras/mL. Este fato mostra que apesar do animal se encontrar clinicamente normal, o mesmo apresenta leptospiras circulantes, podendo servir como reservatório com a eliminação de leptospiras pela urina.

No caso de micro-organismos que apresentam maior dificuldade para seu isolamento, a utilização da PCR é de grande importância, já que permite detectar pequenas quantidades de DNA do patógeno, pela sua alta sensibilidade (19). Ela vem sendo utilizada cada vez mais na clínica diária e não somente em pesquisa (14,20,21), melhorando a sensibilidade diagnóstica em muitas situações.

CONCLUSÕES

O sorogrupo *Icterohaemorrhagiae* com os sorovares *Copenhageni* e *Icterohaemorrhagiae* foram os mais frequentes, e responderam com títulos mais elevados. Com relação à idade, não houve diferenças entre as faixas etárias e os machos apresentaram 1,35 vezes mais chance de se infectarem em relação às fêmeas.

Sugere-se a realização com maior frequência de exames sorológicos para leptospirose em animais recebidos em Centros de Controle de Zoonoses, como atividade de vigilância, pois os cães fazem parte da cadeia epidemiológica de transmissão da leptospirose humana, pela possibilidade de eliminação da leptospiras pela urina. Desta forma pode-se conhecer a dispersão dos vários sorovares no meio ambiente e os riscos de infecção para humanos e animais.

REFERÊNCIAS

1. Coiro CJ, Langoni H, Da Silva RC, Ullmann LS. Fatores de risco para leptospirose, leishmaniose, neosporose e toxoplasmose em cães domiciliados e peridomiciliados em Botucatu-SP. *Vet Zootec*. 2011;18(3):393-407.
2. Villanueva SYAM, Ezoë H, Baterna RA, Yanagihara Y, Muto M, Koizumi N, et al. Serologic and molecular studies of leptospira and leptospirosis among rats in the Philippines. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;82(5):889-98.
3. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Mathias MA, Diaz MM, Lovett MA, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis*. 2003;3(12):757-771.
4. Fonzar UJD, Langoni H. Geographic analysis on the occurrence of human and canine leptospirosis in the city of Maringá, state of Paraná, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2012;45(1):100-5.
5. Masculli R, Vasconcelos AS, Pinheiro SR, Moraes Z. Inquérito sorológico para leptospirose em cães do município de Santana de Parnaíba, São Paulo, utilizando a campanha de vacinação anti-rábica de 1999. *Arq Inst Biol, São Paulo*. 2001;69(2):25-32.
6. Modolo JR, Langoni H, Padovani CR, Shimabukuro FH, Mendonça AO, Victória C, et al. Investigação soroepidemiológica de leptospirose canina na área territorial urbana de Botucatu, São Paulo, Brasil. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2006;43(5):598-604.
7. Lavinsky MO, Said RA, Strenzel GMR, Langoni H. Seroprevalence of anti-Leptospira spp. antibodies in dogs in Bahia, Brazil. *Prev Vet Med*. 2012;106(1):79-84.
8. Kikuti M, Langoni H, Nobrega DN, Corrêa APFL, Ullmann LS. Occurrence and risk factors associated with canine leptospirosis. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2012;18(1):124-7.
9. Fayne S. *Leptospira and leptospirosis*. Boca Raton, Florida: CRC Press Inc; 1994.
10. Centers for Disease Control and Prevention. Epi Info [Internet]. Atlanta; 2002 [cited 2012 Mar 14]. Available from: <<http://www.cdc.gov/epiinfo/ei2002.htm>>.
11. Dias RA, Garcia RC, Silva DF, Amaku M, Ferreira Neto JS, Ferreira F. Estimativa de populações canina e felina domiciliadas em zona urbana do Estado de São Paulo. *Rev Saude Publica*. 2004;38(4):565-70.

12. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos. Manual de Leptospirose. 2a ed. Brasília: Ministério da Saúde; 1995.
13. Mérien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. J Clin Microbiol. 1992;30(9):2219-24.
14. Triola MF. Introdução à estatística. 9a ed. Rio de Janeiro: LTC; 2005.
15. Rodrigues AMA, Vasconcelos SA, Gonçalves AP, Moraes ZM, Souza GO, Hagiwara MK. Anticorpos revelados pelo teste de inibição do crescimento de leptospiros in vitro (TICL) contra os sorovares Canicola, Icterohaemorrhagiae e Copenhageni em cães adultos revacinados anualmente com vacina comercial contendo bacterinas dos sorovares Canicola, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa e Pomona. Pesq Vet Bras. 2013;33(5):627-34.
16. Stokes JE, Kaneene JB, Schall D, Kruger JM, Miller R, Kaiser L, et al. Prevalence of serum antibodies against six *Leptospira* serovars in healthy dogs. J Am Vet Med Assoc. 2007;230(11):1657-64.
17. Suepaul SM, Carrington CVF, Campbell M, Borde G, Adesiyun AA. Serovars of *Leptospira* isolated from dogs and rodents. Epidemiol Infect. 2010;138(7):1059-70.
18. Batista CSA, Alves CJ, Azevedo SS, Vasconcellos SA, Morais ZM, Clementino IJ, et al. Soroprevalência e fatores de risco para a leptospirose em cães de Campina Grande, Paraíba. Arq Bras Med Vet Zootec. 2005;57 Supl 2:179-85.
19. Mothershed EA, Whitney AM. Nucleic acid-based methods for the detection of bacterial pathogen: present and future considerations for the clinical laboratory. Clin Chim Acta. 2006;363(1-2):206-20.
20. Lilebaum W, Vargas R, Ristow P, Cortez A, Souza SO, Ritchzenhain LJ, et al. Identification of leptospiros spp. carriers among seronegative goats and sheep by polymerase chain reaction. Res Vet Sci. 2009;87(1):16-9.
21. Hamond C, Martins G, Lilebaum W, Medeiros MA. PCR detection of leptospiral carriers among seronegative horses. Vet Rec. 2012;171:105-6.

Recebido em: 19/05/2014

Aceito em: 25/06/2015