

DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE DOENÇAS INFECCIOSAS EM CÃES

 <https://doi.org/10.56238/sevened2024.032-030>

Luanda Ferreira Cipriano

Doutoranda em Medicina Veterinária

Unesp -SP

[luanda.cipriano@unesp.br/](mailto:luanda.cipriano@unesp.br)

<https://orcid.org/0000-0002-8246-3257/>

<http://lattes.cnpq.br/6176296921118786>

Nicole Amoêdo Luvison

Graduanda em Medicina Veterinária

Universidade de Caxias do Sul- UCS

naluvison@ucs.br

<https://orcid.org/0009-0005-5783-8810>

<http://lattes.cnpq.br/7395426062661654>

Ketlin Milena Zardin

Universidade de Caxias do Sul- UCS

ketlinkolling@gmail.com

<https://orcid.org/0009-0004-1683-2271>

<http://lattes.cnpq.br/0685734131130293>

Camille Moreira Bergamo Barros

Graduanda em Medicina Veterinária

União Pioneira de Integração Social- UPIS

bergamovetz@gmail.com

0009-0000-6688-3000

<https://lattes.cnpq.br/9445983420853659>

Gabriela Victoria Araújo Saraiva

Graduanda em Medicina Veterinária

gvictoriasaraiva@gmail.com

61 993068888

0009-0002-0616-0956

Universidade Católica de Brasília - UCB

Lattes: <https://lattes.cnpq.br/9933238062460353>

Dreyd Rodrigues Medeiros

Graduanda em Medicina Veterinária

drmedeiro@me.com

0009-0002-5714-9642

<https://lattes.cnpq.br/9504913789155844>

Barbara Fernandes Werneck Teixeira

Graduanda em Medicina Veterinária
barbarafwt@gmail.com
Universidade Catolica de Brasilia- UCB
<https://orcid.org/0009-0008-7426-4769>
<https://lattes.cnpq.br/1011296974890263>

Édios Meurer Lana da Silva

Graduando em Medicina Veterinária
União Pioneira de Integração Social- UPIS
edmeurerls@gmail.com
0009-0002-0311-5834
<https://lattes.cnpq.br/6899580204036046>

Carolina Aires Martins

Graduanda em Medicina Veterinária
carol.aires@gmail.com
0009-0008-4152-0594
Universidade Católica de Brasília -UCB
Lattes: <https://lattes.cnpq.br/8985736732153179>

Renata Ferreira dos Santos

Doutora em Medicina Veterinária Preventiva
Unesp-SP
renatafdsantos@hotmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-1033-275X>.
<http://lattes.cnpq.br/5559547541688954>

RESUMO

As doenças infecciosas são de grande importância na clínica médica veterinária. O Brasil tem apresentado redução significativa de um grande número de doenças infecciosas, por meio de instrumentos eficazes no diagnóstico precoce das enfermidades infecciosas e consequentemente a adoção de medidas de prevenção e controle. Os testes sorológicos são fundamentais no diagnóstico de doenças infecciosas, pois são eficazes na conclusão de diagnósticos e prognósticos, além de contribuir com a vigilância epidemiológica das doenças. Esse estudo tem o objetivo de contribuir com informações relevantes para os diagnósticos sorológicos das doenças brucelose, parvovirose e leptospirose. O diagnóstico laboratorial das moléstias infecciosas são importante em cães para isolar animais infectados e prevenir infecções secundárias de animais susceptíveis que tenham contato com cães doentes. O diagnóstico clínico é indefinido, pois vários outros agentes patogênicos virais podem causar sintomatologia comum em cães, tais como coronavírus, adenovírus, morbillivírus, rotavírus, reovírus, norovírus. Assim sendo, o diagnóstico sorológico é uma ferramenta fundamental dentro da medicina veterinária, para diagnosticar e tratar de forma específica a ocorrência de patologias comuns entre os cães.

Palavras-chave: Diagnóstico sorológico. Doenças infecciosas.

1 INTRODUÇÃO

Na clínica médica o diagnóstico laboratorial das doenças infecciosas, geralmente, é um recurso diagnóstico complementar, que confirma ou não uma suspeita inicial, sendo algumas vezes necessária a realização de provas adicionais para que se possam esclarecer cada quadro e traçar as diretrizes terapêuticas, preventivas e de controle para determinada enfermidade.

Entre os testes laboratoriais, têm-se as provas sorológicas que consiste na detecção e a quantificação de antígenos e anticorpos. Esses testes apresentam diversas vantagens dentre elas: rapidez, simplicidade, possibilidade de automação, armazenamento de material biológico, baixo custo operacional, oferta de kits comerciais padronizados.

O uso de testes sorológicos têm diversas aplicações: diagnóstico presuntivo e diferencial; diferenciação de fases da doença; diagnóstico de alergias; diagnóstico de doenças autoimunes; diagnóstico de imunodeficiências congênitas; prognóstico da doença; avaliação da eficácia da terapêutica instituída; avaliação da imunidade específica (vacinação); pesquisa de antígenos em células ou tecidos; pesquisas epidemiológicas; pesquisa básica e aplicada.

Nesse sentido, foram selecionadas as doenças brucelose, parvovirose e leptospirose, para realização de um estudo descritivo do diagnóstico sorológico. O sorodiagnóstico da brucelose canina pode ser realizado utilizando as provas de: soroaglutinação rápida (SAR), soroaglutinação lenta (SAL), imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e ELISA (KEID, 2006). Dentre essas provas sorológicas, a mais utilizada no diagnóstico da brucelose canina, por *Brucella canis*, e o teste de imunodifusão em gel de ágar (IDGA).

Para o diagnóstico da parvovirose canina são realizados a detecção do vírus ou antígenos virais em fezes, assim pode-se utilizar diversos métodos, tais como a microscopia eletrônica (ME) ou a imunomicroscopia eletrônica (IME), o isolamento viral em culturas celulares. As técnicas sorológicas empregadas são: reação de hemaglutinação seguida ou não pela inibição da hemaglutinação, ensaios imunoenzimáticos (ELISA), reações de imunofluorescência (IF), imunoperoxidase.

A prova de eleição para o diagnóstico sorológico da leptospirose canina, em laboratórios de referência, é a soroaglutinação microscópica (SAM), pois pode ser escolhidos sorovariedades predominantes em determinadas regiões para o diagnóstico da doença.

Visto a importância dos diagnósticos sorológicos para essas doenças infecciosas de ocorrência relevante na clínica médica de pequenos animais, o objetivo desse trabalho é de elucidar o diagnóstico sorológico dessas doenças infecciosas. Uma vez que, essas enfermidades são importantes do ponto de vista epidemiológico, algumas delas possuem potencial zoonótico, como é o caso da brucelose e leptospirose. Além disso, se não diagnosticadas e tratadas da maneira correta, podem levar o animal a óbito.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BRUCELOSE

2.1.1 Etiologia

O gênero *Brucella* é constituído por bactérias intracelulares facultativas, com seis espécies reconhecidas, cada uma delas acometendo um hospedeiro preferencial. As espécies de *Brucella* são identificadas de acordo com o hospedeiro preferencial, características morfológicas, propriedades metabólicas, sorotipagem e fagotipagem (ALTON et al, 1988).

A brucelose em cães causada pela *Brucella canis* é uma doença contagiosa, transmitida por via sexual ou por via oral, caracterizada principalmente por abortos no terço final da gestação, geralmente após os 45 dias (MINHARRO et al, 2005).

A *B. canis* é uma bactéria Gram-negativa na forma de coco-bastonete, aeróbica, de crescimento lento, não móvel e não formadora de esporos. É bioquimicamente semelhante à *B. suis*, sendo produtora de urease, H₂S negativa, redutora de nitratos, não fermentadora e oxidase positiva (ALTON et al, 1988).

A infecção por *B. canis* é responsável por problemas reprodutivos, como abortamento, falhas de concepção, orquite, epididimite e infertilidade. Sinais clínicos não reprodutivos podem ser observados associados aos tecidos ricos em células endoteliais e infecções assintomáticas também podem ser observados (KEID, 2006). A *B. canis* parasita um limitado número de espécies, cães domésticos e canídeos selvagens são os mais acometidos.

2.1.2 Epidemiologia

A brucelose canina já foi constatada na América, Europa, Ásia e África (CARMICHAEL, 1990). No Brasil, Cortes et al (1988) avaliaram soro sanguíneo de 3386 cães errantes capturados pelo programa de controle de zoonoses do Centro de Controle de Zoonoses da Secretaria de Higiene e Saúde do município de São Paulo, durante o período de 1981 a 1985, em 14 localidades, distribuídas pelas quatro divisões regionais da cidade. Das amostras analisadas 254 (7,50%) foram reagentes positivos na prova de IDGA.

VARGAS et al (1996) relataram um caso de isolamento de *B. canis* de amostras de placenta, fetos abortados e neonatos, provenientes de um canil localizado no município de Uruguaiana, Rio Grande do Sul. Além disso, esses autores observaram por meio da prova de IDGA, que 72,7% (8/11) de animais foram reagentes ao teste.

MEGID et al (1999) observaram brucelose canina em quatro canis diferentes. Os canis apresentaram animais com histórico de aborto, mortalidade em neonatos e nascimentos prematuros. A porcentagem de animais soropositivos para brucelose canina, pela prova de imunodifusão em gel de

ágar, variou de 4,6 a 57,1%. Além disso, os autores observaram associação positiva entre porcentagem de animais positivos e aspectos reprodutivos e condições de aglomeração.

MORAES et al (2002) avaliaram a prevalência de anticorpos anti-*Brucella canis* em cães da microrregião da serra de Botucatu, Estado de São Paulo, por meio de técnica de soroaglutinação rápida em cartão (SAR) e soroaglutinação rápida em cartão com 2-mercaptoetanol (SAR-2ME). Dos 1.072 soros de cães examinados no estudo, verificaram-se reações positivas em 19 (1,77%) na prova de SAR e nove (0,84) na prova de SAR-2ME.

MORAES et al (2002b), com intenção de estudar a prevalência da *B. canis* na Zona Oeste da cidade do Rio de Janeiro, utilizaram 119 cães originários dos bairros que compõem a região da cidade. Pela técnica de soroaglutinação em placa para a identificação de soropositividade para *B. abortus* e para a técnica de imunodifusão em gel de agarose para a identificação de aglutininas para *B. canis*, observaram que 9,2 % (n=11) dos animais foram reagentes para *B. canis* e que não houve reação de positividade para *B. abortus* em qualquer dos animais testados

AZEVEDO et al (2003) investigaram a prevalência da brucelose causada por *Brucella canis* em cães do município de Santana de Parnaíba, SP, Brasil. Para isso, foram examinadas 410 amostras de soro sanguíneo de cães colhidas durante a campanha de vacinação anti-rábica animal. A imunodifusão em gel de ágar (IDGA), utilizando antígeno de lipopolissacarídeos e proteínas de *Brucella ovis*, amostra Reo 198, foi empregada em soros normais como teste de triagem, e, para a confirmação, a mesma técnica foi aplicada em soros tratados pelo 2-mercaptoetanol (IDGA-ME). A reação de fixação de complemento (RFC), utilizando antígeno de *B. ovis*, amostra 63/290, também foi utilizada como prova confirmatória. A determinação da prevalência considerou como positivos os animais que reagiram positivamente nos dois testes confirmatórios (IDGA-ME e RFC). A prevalência da *B. canis* foi de 2,2%.

ALMEIDA et al (2004) com o objetivo de avaliar a prevalência da brucelose canina causada por *B. canis* e *B. abortus* na cidade de Alfenas, Minas Gerais, analisaram amostras de soro sanguíneo de 635 cães. A prevalência de *B. canis* foi de 14,2% (90/635) e a de *B. abortus* de 18,1% (115/635); no teste de triagem apenas 2,8% (18/635) foram confirmados.

KEID et al (2004) analisaram amostras de 171 cães de 12 canis comerciais do Estado de São Paulo. Os exames laboratoriais empregados foram a imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e a hemocultura. De 171 cães examinados, 39 (22,80 %) apresentaram pelo menos um sinal clínico compatível com brucelose, 58 (33,91%) foram positivos pela IDGA e 24 (14,03%) pela hemocultura.

AGUIAR et al. (2005) avaliaram 304 cães de ambiente rural e urbano do município de Monte Negro, Rondônia, através do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), Soroaglutinação Lenta em Tubos (SAL) e 2-Mercaptoetanol (2-ME) para a pesquisa de anticorpos anti-*Brucella abortus* e da Imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e Imunodifusão em gel de ágar com soro tratado com 2-Mercaptoetanol (IDGA- ME) para *Brucella canis*. Foram consideradas positivas as amostras reagentes

nas provas confirmatórias do 2-ME e IDGA-ME. Verificaram-se 56 (18,4%) animais reagentes ao AAT e 12 (4,0%) reagentes a SAL. Apenas um cão (0,3%) foi considerado positivo, confirmado pela prova do 2-ME. Foram observadas 11 (3,6%) reações a IDGA, porém não houve confirmação na prova do IDGA-ME.

CAVALCANTI et al (2006) objetivaram pesquisar anticorpos anti-*Brucella canis* em cães residentes na região metropolitana de Salvador, foram analisadas 85 amostras de soro sanguíneo de cães domiciliados. Para o diagnóstico sorológico da infecção por *Brucella canis*, foi utilizada a prova de imunodifusão em gel de agar, com antígeno de membrana de *Brucella ovis*. Os resultados encontrados indicaram uma soropositividade de 5,88% (5/85), demonstrando a presença de anticorpos anti-*Brucella canis* em cães residentes na região metropolitana de Salvador.

REIS et al (2008) ao conduzirem um estudo sorológico para investigar a frequência da brucelose canina por *Brucella canis* e por *Brucella abortus*, em 500 cães errantes na cidade de São João da Boa Vista/SP - Brasil, utilizando as técnicas de imunodifusão em gel de ágar (antígeno de parede celular de *B. ovis*) e imunoaglutinação em placa com antígeno acidificado tamponado. Observaram baixa frequência de cães infectados por *B. canis* 4/500 (0,8%) e ausência de soros positivos para *B. abortus*.

FERNANDES et al (2013) com o objetivo de determinar a ocorrência de anticorpos anti-*Brucella rugosa* e anti-*Brucella lisa* em cães do município de Natal, Estado do Rio Grande do Norte, Brasil, bem como identificar fatores de risco associados à positividade e realizar a detecção molecular em animais soropositivos, utilizaram soros sanguíneos de 416 cães atendidos em clínicas veterinárias. Para o diagnóstico sorológico da infecção por *Brucella rugosa*, foi empregada a prova de imunodifusão em gel de ágar (IDGA), utilizando antígeno de lipopolissacarídeos e proteínas de *Brucella ovis*, amostra Reo 198 e, para o diagnóstico da infecção por *Brucella lisa*, foi utilizado o teste do antígeno acidificado tamponado (AAT). De animais soropositivos, foram coletadas amostras de sangue com citrato de sódio para o diagnóstico pela reação em cadeia pela polimerase (PCR). A frequência de anticorpos anti-*Brucella rugosa* foi de 28,9% (120/416). Todos os animais foram negativos para anticorpos anti-*Brucella lisa*. Dentre 80 animais soropositivos, o DNA de *Brucella spp.* foi amplificado em três animais (3,8%).

Nesse sentido, dados sobre a ocorrência da brucelose canina causada por *B. canis* no Brasil são pontuais e em sua maioria baseados em exames sorológicos. Observa-se uma ocorrência variando entre 1,32% e 72,7%, de acordo com a região, a população de cães examinada e o teste diagnóstico empregado (KEID, 2006).

2.1.3 Diagnóstico sorológico

Devido às limitações dos procedimentos laboratoriais para o isolamento de microrganismos do gênero *Brucella*, os métodos sorológicos têm se constituído na principal metodologia de diagnóstico

(ALTON et al, 1988). Os primeiros anticorpos a aparecer após a infecção são da classe IgM, indicando infecção recente. Seguido, dos anticorpos da classe IgG, que permanecem por longos períodos, principalmente em infecções crônicas. Como a brucelose canina é uma doença crônica, a principal imunoglobulina a ser detectada pelos testes diagnósticos é a IgG. Apesar de ser a metodologia mais difundida de diagnóstico da brucelose canina, a sorologia apresenta muitos problemas em nosso meio, principalmente ligados à disponibilidade de antígenos e kits para o diagnóstico sorológico (MINHARRO et al, 2005).

O sorodiagnóstico da brucelose canina pode ser realizado empregando-se as seguintes provas: soroaglutinação rápida (SAR), soroaglutinação lenta (SAL), imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e ELISA (KEID, 2006). Dentre essas provas sorológicas, a mais amplamente utilizada no diagnóstico da brucelose por *Brucella canis* em cães encontrasse o teste de imunodifusão em gel de ágar (IDGA). O compartilhamento de antígenos entre *Brucella canis* e *Brucella ovis* possibilita o emprego indistinto de reativos produzidos a partir destes dois microrganismos para o diagnóstico da brucelose em ovinos e caninos. Particularmente, a IDGA tem sido de grande aplicação. Por este teste, os anticorpos podem ser detectados a partir de oito a 12 semanas após a infecção e persistem durante vários anos (MINHARRO, 2005).

Na SAR é utilizado um antígeno elaborado com a *B. ovis* corado com rosa de bengala. Porém, os resultados positivos devem ser interpretados com cautela, pois uma proporção significativa de resultados falso-positivos pode ocorrer nesse teste (GEORGE e CARMICHAEL, 1978). Esse teste apresenta boa sensibilidade, mas a especificidade é muito baixa, ou seja, o resultado negativo é uma forte evidência de que o animal não está infectado, mas apenas 50% dos animais cujos soros apresentam aglutinação são realmente positivos. Logo, animais positivos na SAR não podem ser considerados infectados antes de serem submetidos a um teste confirmatório (MINHARRO, 2005).

A SAL, por sua vez, é o teste sorológico clássico para o diagnóstico da brucelose canina. Fornece os resultados em título (semiquantitativo) e muitas vezes é utilizada para a confirmação da SAR-2ME (CARMICHAEL, 1998). A SAL é menos sensível e um pouco mais específica que a SAR (KEID, 2006).

Nesse sentido, observa-se que o diagnóstico laboratorial constitui ferramenta fundamental para o conhecimento da prevalência da brucelose e para a prevenção e o controle da infecção nas criações de cães. A rápida identificação dos animais infectados é necessária para conter a disseminação da infecção (KEID, 2006).

2.2 PARVOVIROSE

2.2.1 Etiologia

A parvovirose canina é uma doença viral importante em cães. O agente etiológico é o vírus do gênero Parvovírus, da família Parvoviridae. O parvovírus canino é um vírus DNA de fita simples, sem envelope, hemaglutinante (DEZENGRINI et al, 2007). Atualmente, existem dois parvovírus de cães: o CPV tipo 1, também denominado parvovírus diminuto dos cães (CnMV), com pouca importância clínica definida nas gastroenterites, causando principalmente diarreia branda e o CPV-2, que apresenta três subtipos: CPV2a, CPV2b e CPV2c.

O CPV2b é o mais prevalente na população canina e, conseqüentemente, utilizado em vacinais (TRUYEN, 1995). O CPV-2 é responsável por miocardite e gastroenterite hemorrágica em filhotes entre seis semanas e seis meses de idade (DEZENGRINI et al, 2007). O CPV-2 foi sendo substituído gradativamente na população canina por novas variantes antigênicas, ou biótipos, designados CPV-2a e CPV-2b (PRATELLI et al, 2001) e um terceiro biótipo, o CPV-2c, já foi identificado (NAKAMURA et al, 2004).

2.2.2 Epidemiologia

A parvovirose canina é uma doença infecciosa emergente em todo mundo desde a década de 70. No Brasil, surgiu na década de 80. A princípio atingia animais de todas as idades, provocando miocardite em recém-nascidos e enterite em cães jovens; atualmente a doença ocorre principalmente em filhotes (SANTOS et al, 1997).

Desde os primeiros relatos da ocorrência da doença no Brasil (ANGELO et al, 1980; HAGIWARA et al, 1980), o CPV vem se mantendo na população canina do país e diversos estudos têm demonstrado a sua presença em várias regiões do país (BARCELOS et al, 1988).

Desde que emergiu em 1978 como um novo patógeno de cães o CPV continua a evoluir, através da utilização de anticorpos monoclonais específicos e enzimas de restrição, o CPV-2a passou a prevalecer na população canina. A partir de 1984 surgiu uma nova variante, o CPV-2b; apenas 10-30% das amostras de CPV isoladas na Europa e Estados Unidos atualmente são do tipo 2a.

As variações de CPV parecem ser mais adaptadas à replicação em cães, facilitando a disseminação do vírus na população canina. O CPV-2 é transmitido, principalmente, por via oro-fecal, as fezes ou fluidos contaminados constituem a fonte primária da infecção da parvovirose canina (SANTOS et al, 1997). Através de estudos constatou-se que existem semelhanças antigênicas e genéticas entre o vírus da parvovirose e o vírus da panleucopenia felina (GREENWOOD, 1995).

Em 2000, uma nova variante antigênica, CPV-2c, foi detectada na Itália e rapidamente se espalhou para vários países. Em comparação com o tipo de original CPV-2, as variantes antigênicas exibem o aumento da patogenicidade em cães e é capaz de infectar e causar doença em gatos. O

levantamento epidemiológico indica que o mais novo tipo CPV-2c está se tornando prevalentes em diferentes regiões geográficas, sendo considerada uma grave doença em cães filhotes e adultos e também em cães que tenham concluído o protocolo de vacinação. No entanto, a principal causa de falha da vacinação é a deficiência de imunidade de origem materna (DECARO E BUONAVOGLIA, 2012).

As taxas de mortalidade podem ser elevadas em filhotes, mas são geralmente inferior a 1% em cães adultos. Os cães podem apresentar enterite hemorrágica do intestino delgado e aumento dos linfonodos mesentéricos e Peyer (DECARO E BUONAVOGLIA, 2012).

O diagnóstico de parvovirose se dá através de exame de fezes, onde pesquisa-se, através de testes de hemaglutinação (HÁ), o ensaio imunoenzimático, a reação em cadeia da polimerase (PCR), e o isolamento viral em cultivo enzimático (STROTTMANNI et al, 2007).

O isolamento em cultivo celular é considerado o teste padrão, porém a PCR e a HA têm sido amplamente utilizadas principalmente pela alta especificidade e praticidade destes testes (STROTTMANNI et al, 2007).

A parvovirose possui alta taxa de morbidade e de mortalidade, devido a falta de imunidade de cães contra o parvovírus, principalmente em filhotes entre 6 semanas a 6 meses (MORAES E COSTA, 2007). Cães filhotes apresentam mais propensão a ter a doença, porém cães de qualquer idade podem apresentar a gastroenterite hemorrágica. Cães de raça como Doberman, Labrador, PittBull, Rottweiler e Pastor Alemão são mais susceptíveis a desenvolver a doença (MORAES E COSTA, 2007).

A profilaxia da infecção por CPV depende principalmente da vacinação. Uma vez que as vacinas inativadas são capazes de induzir a uma imunidade em curto prazo, o vírus vivo modificado em vacinas são amplamente utilizados. Estas vacinas a base do vírus CPV-2 ou a sua variante CPV-2b, são altamente eficaz, sendo capaz de proteger cães contra o parvovírus e reações pós-vacinal são muito raramente observadas. Um estudo recente mostrou que a maioria dos cães que contraíram a enfermidade após a vacinação foram infectados pelo vírus sozinho ou com o vírus vacinal atenuado. (DECARO et al, 2007).

As principais causas de insucesso da vacinação contra parvovirose estão relacionadas à imunidade transmitida por cadelas à sua descendência através do colostro e numa menor medida, ao leite materno (DECARO et al, 2007).

Cães adultos são resistentes à infecção por parvovírus devido a imunidade específica induzida por vacinação ou infecções anteriores (muitas vezes subclínicos). Embora a infecção por CPV é geralmente restrita a jovens animais, nota-se que cães adultos também contraem essa doença (DECARO et al, 2007b).

2.2.3 Diagnóstico sorológico

O diagnóstico laboratorial da infecção pelo CPV é importante em cães para isolar animais infectados e prevenir infecções secundárias de animais susceptíveis que tenham contato com cães doentes. O diagnóstico clínico é indefinido, pois vários outros agentes patogênicos virais podem causar diarreia em cães, tais como coronavírus, adenovírus, morbillivírus, rotavírus, reovírus, norovírus. Assim, um caso clínico suspeito deve ser sempre confirmado por testes de laboratório. Vários métodos têm sido desenvolvidos para o diagnóstico laboratorial da infecção pelo CPV, utilizando-se as fezes (ou conteúdo intestinal se o animal estiver morto) dos cães afetados (DECARO et al, 2007b).

Para que o resultado de detecção de CPV-2 nas amostras fecais não se apresente falso negativo, é necessário que a coleta seja feita precocemente durante o curso da infecção. A resposta imune para esse vírus se generaliza rapidamente, iniciando-se quatro a cinco dias após a infecção. Consequentemente o vírus só pode ser detectado nas fezes durante um curto período de tempo (três a quatro dias) após o início dos sinais clínicos (SANTOS et al, 1997). O CPV-2 é muito resistente ao meio ambiente, permanecendo estável por até seis meses fora da célula, se mantido a 4°C (SANTOS et al, 1997). A detecção de partículas virais em fezes de pacientes suspeitos, pode ser realizada através dos métodos de isolamento viral, cultivo celular ou ELISA, microscopia eletrônica, hemaglutinação direta (DE MARI et al, 2003).

Os teste sorológicos indiretos, como hemaglutinação, soroneutralização, ELISA indireto e imunofluorescência podem detectar infecções passadas. Na primeira semana, observa-se concentrações séricas elevadas de IgM, seja pelo início da infecção ou pelo estímulo vacinal com o vírus atenuado (DE MARI et al, 2003).

A partir da segunda semana, observa-se aumento da concentração sérica de IgG (DE MARI et al., 2003). O isolamento em cultivo celular é considerado o teste padrão, mas a reação pela cadeia da polimerase (PCR) é amplamente utilizada, pela alta especificidade e sensibilidade do teste, quando comparada ao ELISA. A detecção de material genético pela PCR é atualmente o método de escolha, pois contribuiu para excluir muitos falsos positivos e falsos negativos (DE MARI et al, 2003).

A imunoperoxidase (IPX) é uma técnica que pode ser aplicada em monocamadas celulares, sendo denominada de imunocitoquímica e em esfregaços ou diretamente em tecidos, sendo chamada de imunohistoquímica. Esses métodos detectam a multiplicação do vírus em cultivo celulares ou em tecidos, confirmando a presença do agente (DE MARI et al, 2003).

O teste de hemaglutinação (HA) é utilizado para identificar e quantificar o CPV. Para esse teste, utiliza-se placas de diluições seriadas da suspensão fetal, em igual volume de solução salina. O teste de inibição da hemaglutinação (HI) detecta anticorpos anti-CPV. Para tanto, realizaram-se diluições seriadas (base 10) do soro (inativado a 56°C e tratado com caolin a 25% e hemácias de suíno a 50%) em igual volume de BBS, contendo 2% de SFB. Posteriormente, acrescentaram-se oito unidades HA

(UHA) da amostra viral e incuba-se a placa em câmara úmida a 37°C, durante duas horas. Após, adiciona-se uma suspensão de hemácias de suíno, seguida de incubação a 4°C por duas horas (SENDA et al, 1986). O título de anticorpos foi considerado a recíproca da maior diluição que inibiu a HA.

A técnica de HI também foi utilizada para confirmar a identidade do CPV nas amostras fecais. (STROTTMANN et al, 2008). Para que o resultado de detecção de CPV-2 nas amostras fecais não se apresente falso negativo, é necessário que a coleta seja feita precocemente durante o curso da infecção. A resposta imune para esse vírus se generaliza rapidamente, iniciando-se quatro a cinco dias após a infecção. Conseqüentemente o vírus só pode ser detectado nas fezes durante um curto período de tempo (três a quatro dias) após o início dos sinais clínicos (SANTOS et al., 1997). O CPV-2 é muito resistente ao meio ambiente, permanecendo estável por até seis meses fora da célula, se mantido a 4°C (SANTOS et al, 1997).

2.3 LEPTOSPIROSE

2.3.1 Etiologia

A leptospirose é uma doença infecto-contagiosa que acomete os animais domésticos e o homem, causada por bactérias, espiroquetas, que pertencem à família Leptospiraceae, gênero *Leptospira*. São longas, delgadas e de forma espiralada, podem apresentar extremidades em gancho e são classificadas por mais de 200 sorovares, destacando-se o Canicola, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Grippotyphosa, Autumnalis, Bratislava, Hardjo, Pyrogenes, Copenhageni, Ballum, Tarassovi, dentre outros (MELLO E MANHOSO, 2007).

A doença tem um forte significado sócio-econômico-cultural, e é difundida por fatores como o crescimento desordenado de grandes centros urbanos, as migrações, as deficiências nas condições de saneamento básico e o acúmulo desordenado de lixo, que promove a expansão da população de roedores. A persistência do agente na natureza e o elevado potencial de infecção são assegurados pela diversidade de identidades sorológicas, a multiplicidade de espécies hospedeiras e o relativo grau de sobrevivência no ambiente sem parasitismo (em condições de alto grau de umidade, proteção contra raios solares, temperaturas adequadas e pH neutro ou levemente alcalino), ainda que as leptospirosas patogênicas não se multipliquem fora do organismo dos hospedeiros (CÔRTEZ, 1993).

A leptospirose é um agente comumente envolvido em problemas reprodutivos, abortos e infertilidades (GREENE E CARMICHAEL, 2006). Febre e icterícia podem acompanhar ou preceder abortamentos, morte de neonatos, morte de recém-nascidos com poucas semanas de vida. Doenças reprodutivas têm sido descritas em canis e estão geralmente associadas à sorovariedade Bratislava (GRAHAM E TAYLOR, 2012).

As sorovariedades mais comumente associadas e conhecidas da leptospirose canina clássica são a Icterohaemorrhagiae e a Canicola (SCANZIANI et al, 1994). Algumas das sorovariedades que têm

sido encontrados, inclusive no Brasil, infectando cães e causando quadros mórbidos ou infecções benignas são: Pomona, Castellonis, Pyrogenes, e Copenhageni (DICKESON e LOVE, 1993; BRIHUEGA e HUTTER, 1994). A prevalência encontrada em populações caninas brasileiras tem variado entre 10 a 22% (ALVES et al, 2000).

2.3.2 Epidemiologia

A ocorrência da leptospirose é variável nas diferentes regiões do mundo, podendo apresentar-se tanto na forma esporádica quanto na endêmica; e a ocorrência da sorovariedades de *Leptospira* spp varia de acordo com a região geográfica.

No Rio de Janeiro, em 1940, 11 cães com manifestações clínicas compatíveis com leptospirose foram submetidos à necropsia para confirmar a presença do agente causador da leptospirose em cães no Brasil (DACORSO FILHO, 1940). Em Pelotas, Rio Grande do Sul, com a finalidade de se conhecer a prevalência e fatores de risco. Foram examinadas 489 amostras sorológicas de cães provenientes de 213 propriedades. As amostras foram submetidas à técnica de soroaglutinação microscópica (SAM), sendo detectadas 13 (2,66%) positivas com títulos de anticorpos variando de 50 a 800, para os sorovares Icterohaemorrhagiae, Australis, Copenhageni, Pyrogenes, Sentot e Canicola (JOUGLARD E BROD, 2000).

LILENBAUM et al (2000) ao avaliarem a ocorrência de evidências sorológicas de leptospirose entre a população canina de centro urbano localizado na região amazônica, com identificação das sorovariedades prevalentes, examinaram pelo método de soroaglutinação microscópica (SAM) amostras sanguíneas de 185 caninos do município de Oriximiná, Pará, localizado dentro da região amazônica. Do total de amostras analisadas, 34 (18,4%) mostraram-se reativas, com título mínimo de 100. As sorovariedades mais frequentemente encontrados foram Canicola e Icterohaemorrhagiae, além de Copenhageni, também pertencente ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae.

MASCOLLI et al (2002) avaliaram o potencial zoonótico da população canina do município de Santana de Parnaíba, São Paulo, com relação à leptospirose. Para isso, coletaram 410 amostras de soro canino e a leptospirose foi determinada através da técnica de soroaglutinação microscópica, utilizando uma coleção de 22 variantes sorológicas. Foi encontrada positividade de 15%, com maior frequência das variantes Copenhageni (24%), Canicola (16%) e Hardjo (16%).

QUERINO et al (2003) avaliaram a frequência de cães soropositivos para leptospirose, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina. Foram estudados 160 cães de ambos os sexos e não vacinados contra leptospirose, entre março de 1997 e abril de 1998. Todos os animais foram submetidos à prova de aglutinação microscópica e ao exame direto da urina. Foram detectados títulos de anticorpos 100 em 40 cães, sendo em maior frequência contra o sorovar Pyrogenes (45,00%) e 24 animais foram positivos no exame direto da urina. Os autores reforçaram que os resultados servem

como alerta em relação a possibilidade de exposição humana a alguns fatores de risco para a leptospirose a que estão expostos estes cães.

Em Botucatu – SP, investigaram-se, soroepidemiologicamente, a leptospirose em 775 cães, em amostras de sangue, obtidas durante a campanha anual de vacinação anti-rábica. Para o diagnóstico, foi realizada a soroaglutinação microscópica, utilizando-se 12 sorovares de *Leptospira* spp. Obtiveram-se 119 (15,3%) amostras positivas, com reação para 11 sorovares, com maior importância para o canicola, em 48 (40,3%) amostras, e pyrogenes, em 41 (34,5%) (MODOLO et al, 2006).

MAGALHÃES et al (2007) ao processarem 3417 amostras de soros, observaram em 448 (13,1%) amostras reações positivas à SAM, para uma ou mais sorovariedades de *Leptospira* spp., com títulos que variaram de 200 a 25.600. As maiores frequências de reações positivas foram para as sorovariedades Canicola (7,0%), Ballum (6,1%), Pyrogenes (3,2%) e Icterohaemorrhagiae (2,9%), as demais apresentaram frequência inferior a 1,0%.

Visto essa distribuição epidemiológica, nota-se que os cães são considerados uma importante fonte de infecção da leptospirose, uma vez que diversos estudos relatam a presença de animais reagentes. E nesse sentido o estreito contato com o homem, eliminando leptospirosas vivas pela urina durante vários meses, sem apresentar sinal clínico característico, representam um risco a saúde humana, sendo assim importante a prevenção e o controle da doença nos cães.

2.3.3 Diagnóstico sorológico

Para o diagnóstico da leptospirose canina é necessário a realização de exames laboratoriais, sendo o exame bacteriológico considerado definitivo (SANTA ROSA, 1970; FAINE et al, 1999). A visualização direta de leptospirosas em microscópio de campo escuro tem sido utilizada principalmente em amostras de urina durante a fase de leptospiúria. Entre as provas sorológicas, a soroaglutinação microscópica (SAM) com antígenos vivos é a mais utilizada em todo mundo (FAINE et al, 1999). Provas laboratoriais como o hemograma, dosagem dos valores séricos de ureia e creatinina e urinálise, podem ser utilizadas como exames complementares, pois indicam as alterações funcionais nos diferentes órgãos acometidos.

Para o diagnóstico de leptospirose, por meio da sorologia, deve-se considerar: a escolha da prova confirmatória; da coleção de antígenos utilizada, pois para um diagnóstico mais preciso deve ser levado em conta a prevalência a determinadas sorovariedades em certas regiões; da reação antígeno e anticorpo, pois há existência de reações cruzadas entre as sorovariedades e outras doenças como babesia e brucelose. Das variáveis relacionadas à localização, áreas consideradas endêmicas devido a fatores como saneamento básico precário, período do ano em que as coletas foram efetuadas, em função da maior ou menor precipitação pluviométrica e pela espécie animal, por algumas serem reservatórios naturais para alguns sorovares (FAVERO et al, 2002).

Na rotina clínica, a confirmação do diagnóstico clínico e epidemiológico se dá pela pesquisa de anticorpos específicos no soro, por meio do teste de soroaglutinação microscópica (SAM), ou teste de aglutinação macroscópica em lâmina (LEVETT, 2001). Dentre os métodos sorológicos, a soroaglutinação microscópica (COLE JR et al, 1973) é o mais comumente utilizado, sendo designado como teste de referência pela OIE (OIE, 2008), no qual o soro sanguíneo reage com os antígenos vivos de leptospira e, para sua realização, utiliza-se uma bateria de antígenos com os sorovares representantes de cada sorogrupo. Os soros de indivíduos com títulos positivos geralmente apresentam reações cruzadas a uma variedade de sorovares, dificultando a identificação do sorovar infectante (WHO, 1967) é, por isso, a soroaglutinação microscópica pode ser considerada um teste específico de sorogrupo (FAINE, 1999).

Na bateria de antígenos deve se incluir sorovares representativos da região estudada. Para a confirmação sorológica da leptospirose em um indivíduo, recomenda-se aumento de quatro vezes no valor do título de anticorpos aglutinantes entre a fase aguda e a convalescença (GALTON et al, 1965). Em áreas endêmicas, uma única amostra com título igual ou maior a 800 pode ser considerada diagnóstica, mas recomenda-se a utilização iguais ou maiores que 1.600 para essa decisão (WHO, 2003). Outros métodos sorológicos, tais como ELISA, têm sido utilizados principalmente para a distinção entre anticorpos IgM e IgG (HARTMAN et al, 1984) e diversas modificações têm sido aplicadas (LEVETT, 2001). Ainda, métodos como a aglutinação macroscópica em lâmina (BRANDÃO et al, 1998), radioimunoensaio (KAWAOKA et al, 1979) e hemaglutinação indireta (SULZER e JONES, 1973) têm sido utilizados, mas são mais apropriados para o diagnóstico da leptospirose humana.

Para a realização da técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM), considerada “padrão ouro” (OIE, 2008), os antígenos de *Leptospira* spp. utilizados nos testes sorológicos são repicados semanalmente em meio de cultura líquido de EMJH (Ellinghausen, McCullough, Johnson e Harris), tendo como inóculo 10% do volume do meio a semear, e mantidos em estufa bacteriológica B.O.D a $29^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (OIE, 2008).

As amostras de soro sanguíneo são diluídas em solução salina, sendo a diluição inicial 1/25. Aliquotas de 25 μL são colocadas em placas de poliestireno, com fundo chato, e adicionada igual quantidade de antígeno, das sorovarietades prevalentes na região, resultando na diluição de 1/50. A mistura soro-antígeno é homogeneizada e incubada em estufa BOD à temperatura de 28°C por 40 a 120 minutos, procedendo-se a seguir à leitura em microscopia de campo escuro, com objetiva e ocular de 10x, diretamente dos poços da placa.

Serão consideradas reagentes as amostras em que ocorreram 50% de aglutinação, estando metade das leptospiplas aglutinadas no campo microscópico no aumento de 100 vezes. As amostras

reagentes na diluição inicial serão testadas com diluições seriadas de razão dois, sendo a primeira diluição 1/100, conforme a recomendação da OIE (2008).

3 CONCLUSÃO

O diagnóstico laboratorial das doenças brucelose, leptospirose e parvovirose são importantes em cães para isolar e tratar animais infectados e prevenir infecções secundárias de animais susceptíveis que tenham contato com cães doentes. O diagnóstico clínico, muitas vezes é indefinido, pois vários outros agentes patogênicos virais podem causar sinais clínicos dessas doenças. Assim, um caso clínico suspeito deve ser sempre confirmado por testes de laboratório. Vários métodos têm sido desenvolvidos para o diagnóstico laboratorial dessas enfermidades.

A infecção por brucelose, por exemplo, possui uma importância sócio-econômica, por ser responsável por problemas reprodutivos, como abortamento, falhas de concepção, orquite, epididimite e infertilidade. Sendo de fundamental importância o diagnóstico dessa doença, a fim de que sejam controladas as perdas econômicas geradas em rebanhos bovinos por essa patologia.

No caso da leptospirose, a doença tem um forte significado sócio-econômico-cultural, e é transmitida por fatores relacionados às más condições de saneamento básico e o acúmulo desordenado de lixo, que promove a expansão da população de roedores, tratando-se de uma zoonose importante, devendo-se, portanto ser bem diagnosticada, para se obter um maior controle da doença na população.

A parvovirose é uma doença de alta morbidade e mortalidade em cães, possuindo sinais clínicos comuns de outras doenças que acometem cães, sendo assim somente o diagnóstico clínico torna-se insuficiente para confirmação dessa doença, e por isso observa-se a importância do diagnóstico laboratorial que consegue confirmar a doença e consequentemente tratar de forma específica os cães acometidos, podendo-se dessa forma, minimizar a ocorrência da disseminação agente patológico dentro da população canina.

Esse estudo visa mostrar a necessidade do diagnóstico sorológico, como ferramenta fundamental dentro da medicina veterinária, para diagnosticar e tratar de forma específica a ocorrência de patologias comuns entre os cães.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, D. M. et al. Ocorrência de anticorpos anti-Brucella abortus e anti-Brucella canis em cães rurais e urbanos do Município de Monte Negro, Rondônia, Brasil. *Ciência Rural*, v. 35, n. 5, 2005.
- ALMEIDA, A. C. et al. Soroepidemiologia da brucelose canina causada por Brucella canis e Brucella abortus na cidade de Alfenas, MG. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 56, n. 2, p. 275-276, 2004.
- ALTON, G. G. et al. Techniques for the brucellosis laboratory. Paris: Institut National de la Recherche Agronomique, 1988. 545 p.
- ALVES, C. J. et al. Avaliação dos níveis de aglutininas anti-leptospira em cães no município de Patos – PB, Brasil. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 7, n. 1, p. 17-21, jan./abr. 2000.
- ANGELO, M. J. O. et al. Isolamento de parvovírus canino no Brasil. *Revista da Faculdade de Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo*, v. 25, p. 123-134, 1988.
- AZEVEDO, S. S. et al. Inquérito sorológico e fatores de risco para a brucelose por Brucella canis em cães do município de Santana de Parnaíba, Estado de São Paulo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 23, n. 4, p. 156-160, 2003.
- BARCELOS, V. H. L. Prevalência de anticorpos inibidores da hemaglutinação frente ao parvovírus canino em Santa Maria, RS, Brasil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, n. 10, v. 6, p. 99-102, 1988.
- BRANDÃO, A. P. et al. Macroscopic agglutination test for rapid diagnosis of human leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, n. 11, p. 3138-3142, 1998.
- BRIHUEGA, B.; HUTTER, E. Incidência de la leptospirosis en caninos de la ciudad de Buenos Aires. *Veterinaria Argentina*, v. 11, n. 102, p. 98-101, 1994.
- CARMICHAEL, L. E. Brucella canis. In: NIELSEN, K.; DUNCAN, J. R. (Ed.). *Animal brucellosis*. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 335-350.
- CARMICHAEL, L. E. Brucelosis canina causada por B. Canis: enfermidade clínica; problemas em imunodiagnóstico. *Revista Medicina Veterinária*, v. 80, p. 102-106, 1998.
- CAVALCANTI, L. A. et al. Pesquisa de anticorpos anti-Brucella canis em cães provenientes da região metropolitana de Salvador. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v. 7, n. 2, p. 176-180, 2006.
- COLE, J. R.; SULZER, C. R.; PULSSELY, P. R. Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination. *Applied Microbiology*, v. 25, n. 6, p. 976-980, 1973.
- CORTES, V. A. et al. Reações sorológicas para Brucella canis em cães errantes capturados na proximidade dos parques públicos, reservas florestais e em áreas periféricas do município de São Paulo-Brasil. *Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 25, n. 1, p. 101-107, 1988.
- CÔRTEZ, J. A. Aspectos epidemiológicos e ecológicos da leptospirose. In: ENCONTRO NACIONAL EM LEPTOSPIROSE, 3., 1993, Rio de Janeiro, RJ. Ministério da Saúde. Instituto Oswaldo Cruz. Fundação Nacional de Saúde. Resumos, p. 53-57.
- DACORSO FILHO, P. Leptospirose canina. *O Hospital*, v. 18, p. 797-809, 1940.

DE MARI, K.; MAYNARD, L.; EUN, H. M.; LEBREUX, B. Treatment of canine parvoviral enteritis with interferon-omega in a placebo-controlled field trial. *Veterinary Record*, v. 152, n. 4, p. 105-108, 2003.

DECARO, N. et al. Molecular epidemiology of canine parvovirus. *Emerging Infectious Diseases*, v. 13, n. 8, p. 1222-1224, 2007.

DECARO, N.; BUONAVOGLIA, C. Canine parvovirus, a review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Veterinary Microbiology*, v. 155, p. 1-12, 2012.

DEZENGRINI, R.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Soroprevalência das infecções por parvovírus, adenovírus, coronavírus canino e pelo vírus da cinomose em cães de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*, v. 37, n. 1, p. 183-189, 2007.

DICKESON, D.; LOVE, D. N. A serological survey of dogs, cats and horses in south-eastern Australia for leptospiral antibodies. *Australian Veterinary Journal*, v. 70, n. 10, p. 389-390, 1993.

FAINE, S. et al. *Leptospira and leptospirosis*. 2. ed. Melbourne: Medisci, 1999. 272 p.

FAVERO, A. C. M. et al. Sorovares de leptospiros predominantes em exames sorológicos de bubalinos, ovinos, caprinos, equinos, suínos e cães de diversos Estados brasileiros. *Ciência Rural*, v. 32, n. 4, p. 613-619, 2002.

FERNANDES, A. R. F. et al. Inquérito sorológico e molecular da brucelose canina no município de Natal, Estado do Rio Grande do Norte. *Ciência Rural*, v. 43, n. 9, 2013.

GALTON, M. M.; SULZER, C. R.; SANTA ROSA, C. A.; FIELDS, M. J. Application of a microtechnique to the agglutination test for leptospiral antibodies. *Applied Microbiology*, v. 13, n. 1, p. 81-85, 1965.

GEORGE, L. W.; CARMICHAEL, L. E. Development of a rose bengal-stained plate-test antigen for the rapid diagnostic of *Brucella canis* infection. *Cornell Veterinary*, v. 68, p. 530-543, 1978.

GRAHAM, E. M.; TAYLOR, D. J. Bacterial reproductive pathogens of cats and dogs. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, v. 42, n. 3, p. 561-582, 2012.

GREENE, C. E.; CARMICHAEL, L. E. Canine brucellosis. In: GREENE, C. E. (Ed.). *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 3. ed. Philadelphia: Elsevier, 2006. p. 369-380.

HARTMAN, E. G.; VAN HOUTEN, M.; FRIK, J. F.; VAN DER RONK, J. A. Humoral immune response of dogs after vaccination against leptospirosis measured by an IgM and IgG-specific ELISA. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 7, n. 3-4, p. 245-254, 1984.

HAGIWARA, M. K. et al. Enterite hemorrágica em cães associada à infecção por um parvovírus. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 47, n. 1/2, p. 47-49, 1980.

JOUGLARD, S. D. D.; BROD, C. S. Leptospirose em cães: prevalência e fatores de risco no meio rural do município de Pelotas, RS. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 67, n. 2, p. 181-185, jul./dez. 2000.

KAWAOKA, Y.; NAIKI, M.; YANAGAWA, R. Radioimmunoassay system using a serovar-specific lipopolysaccharide antigen of *Leptospira*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 10, n. 3, p. 313-316, 1979.

KEID, L. B. et al. *Brucella* spp. Isolation from dogs from commercial breeding kennels in São Paulo State, Brazil. *Brazilian Journal Microbiology*, v. 35, p. 161-166, 2004.

KEID, L. B. Avaliação de métodos diretos e indiretos de diagnóstico da brucelose em cães naturalmente infectados. 2006. 134 f. Tese (Doutor em Medicina Veterinária) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 14, n. 2, p. 296-326, 2001.

LILENBAUM, W.; RODRIGUES, F.; BARBOZA, F. Aglutininas antileptospiras em caninos do município amazônico de Oriximiná-Pará, Brasil. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 7, n. 3, p. 133-135, set./dez. 2000.

MAGALHÃES, D. F. 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*, v. 59, n. 5, p. 1326-1329, 2007.

MASCOLLI, R. et al. Inquérito sorológico para leptospirose em cães do município de Santana de Parnaíba, São Paulo, utilizando a campanha de vacinação anti-rábica do ano de 1999. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 69, n. 2, p. 25-32, abr./jun. 2002.

MEGID, J. et al. Epidemiological assessment of canine brucellosis. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 51, n. 5, 1999.

MELLO, L. P. P.; MANHOSO, F. F. R. Aspectos epidemiológicos da leptospirose canina no Brasil. *Unimar Ciências*, v. 16, n. 1-2, p. 27-32, 2007.

MINHARRO, S. et al. Diagnóstico da brucelose canina: dificuldades e estratégias. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 29, n. 3/4, p. 167-173, 2005.

MODELO, J. R. et al. Investigação soroepidemiológica de leptospirose canina na área territorial urbana de Botucatu, São Paulo, Brasil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 43, n. 5, p. 598-604, 2006.

MORAES, C. C. G. et al. Prevalência da brucelose canina na microrregião da Serra de Botucatu, São Paulo, Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 69, n. 2, p. 7-10, 2002.

MORAES, L. A. et al. Identificação de cães potencialmente transmissores de brucelose na Zona Oeste da cidade do Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 9, n. 3, p. 154-157, 2002.

MORAES, M.; COSTA, P. Parvoviridae. In: FLORES, E. F. (Ed.). *Virologia Veterinária*. 1. ed. Santa Maria, RS: Ed. da UFSM, 2007. cap. 14, p. 382, 2007.

NAKAMURA, M. et al. A novel antigenic variant of canine parvovirus from a Vietnamese dog. *Archives of Virology*, v. 149, p. 2261-2269, 2004.

OIE – WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals. 2008. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.09_LEPTO.pdf. Acesso em: 06 nov. 2013.

PRATELLI, A. L. et al. Canine parvovirus (CPV) vaccination: comparison of neutralizing antibody responses in pups after inoculation with CPV2 or CPV2b modified live virus vaccine. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 8, n. 3, p. 612-615, 2001.

QUERINO, A. M. V. et al. Fatores de risco associados à leptospirose em cães do município de Londrina-PR. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 24, n. 1, p. 27-34, jan./jun. 2003.

REIS, C. B. M. et al. Pesquisa de anticorpos anti-*Brucella canis* e anti-*Brucella abortus* em cães errantes da cidade de São João da Boa Vista, Estado de São Paulo, Brasil (2002-2003). *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 45, n. 1, p. 32-34, 2008.

SANTOS, P. et al. Padronização de reagentes e métodos utilizados na técnica de hemaglutinação para o diagnóstico laboratorial da parvovirose canina. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 4, n. 3, p. 111-115, set./dez. 1997.

SCANZIANI, E.; CALCATERRA, S.; TAGLIABUE, S. Serologic findings in cases of acute leptospirosis in the dog. *Journal of Small Animal Practice*, n. 35, p. 257-260, 1994.

SANTA ROSA, C. A. Diagnóstico laboratorial das leptospiroses. *Revista de Microbiologia*, v. 1, n. 2, p. 97-109, 1970.

SENDA, M. et al. An improved hemagglutination test for study of canine parvovirus. *Veterinary Microbiology*, v. 12, p. 1-6, 1986.

STROTTMANN, D. M. et al. Diagnóstico e estudo sorológico da infecção pelo parvovírus canino em cães de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*, v. 38, n. 2, p. 400-405, 2008.

SULZER, C. R.; JONES, W. L. Evaluation of a hemagglutination test for human leptospirosis. *Applied Microbiology*, v. 26, n. 5, p. 655-657, 1973.

TRUYEN, U. et al. Evolution of the feline-subgroup parvoviruses and the control of canine host range in vivo. *Journal of Virology*, v. 69, n. 9, p. 4702-4710, 1995.

VARGAS, A. C.; LAZZARI, A.; DUTRA, V.; POESTER, F. Brucelose canina: relato de caso. *Ciência Rural*, v. 26, n. 2, 1996.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Current problems in leptospirosis research: Report of a WHO expert group. 1967. (Technical Report Series of the World Health Organization n. 380).

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. 2003. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.23.pdf. Acesso em: 06 jun. 2016.