

Relatório de 3 investigações sorológicas para leptospirose canina, realizadas por meio das técnicas de soroaglutinação microscópica (SAM / MAT) e kit elisa-dot Immunocomb® Leptospira IgG Canina.

Colaboradores:

Fernando Staude Kloster¹, João Victor Agottani Alberti¹, Jorge Victor Bacila Agottani¹, José Francisco Warth², Maria Beatriz López Peralta²,

¹Laboratório Veterinária Preventiva – Curitiba, Paraná, Brasil;

²Laboratório de Microbiologia Veterinária, Universidade Federal do Paraná – Curitiba, Paraná, Brasil;

³Centro de Diagnóstico *Marcos Enrietti*, Agência de Defesa Agropecuária do Paraná – Curitiba, Paraná, Brasil.

Resumo

Foram realizadas três investigações sorológicas de canino, para pesquisa de anticorpos anti-*leptospira*.

- 1- **A primeira investigação** ocorreu no Laboratório VP Laboratório de Análises/Veterinária Preventiva, em 2014 testando-se 240 soros.
- 2- **A segunda investigação** foi realizada na Universidade Federal do Paraná em 2016, com amostras de 16 cães da raça Beagle, vacinados contra leptospirose, com uma série de 4 vacinações.
- 3- **A terceira investigação**, foi realizada em 2019, com 150 amostras de soros de cães com suspeita de Leptospirose, recebidas pelo Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti (ADAPAR/PR). Das 150 amostras, 100 com resultado negativo e 50 com resultado positivo, pela técnica de SAM / MAT. Estes soros foram repassados para a Indústria Biogal, que produz os Kits DOT-ELISA ImmunoComb®.

A primeira investigação, realizada em 2014, tinha o objetivo de averiguarmos 240 soros recebidos pelo Laboratório Veterinária Preventiva, com suspeita de leptospira, os quais foram testados pela Técnica Soroaglutinação Microscópica(SAM/MAT), frente ao Kit DOT-Elisa ImmunoComb® Leptospira IgG.

Como é um kit que determina a presença de IgG e esta imunoglobulina já está presente na corrente sanguínea a partir de 7 dias após a infecção, pode ser utilizado principalmente nas cidades do interior, que tem imensa dificuldade de enviar as amostras para os Laboratórios que realizam a SAM/MAT.

O mix de sorovares presentes no kit ImmunoComb® são, *L. icterohaemorrhagiae* (copenhageni e RGA), *L. canicola*, *L. pomona* e *L. grippotyphosa*.

Alguns soros positivos na SAM apresentavam resultados negativos no ImmunoComb® e o inverso também. A

conclusão que tiramos a princípio era que o ImmunoComb® não funcionava como deveria.

Em 2016, foi realizada a segunda investigação, e obtivemos a resposta para nossas dúvidas.

O Pesquisador Dr José Francisco Warth, professor da Faculdade de Veterinária da UFPR, estava preocupado com as vacinações contra *Leptospira*.

Poucos meses após a vacinação, os soros de animais vacinados com vacinas inativadas testados na SAM/MAT obtiveram resultados negativos.

Sua pesquisa constituiu-se em uma série de 4 vacinações. Após a coleta de amostras, constatou-se, mesmo com as 3 séries de vacinas, pela técnica SAM/MAT, que os cães não estavam produzindo anticorpos contra os sorovares das vacinas.

Foi realizado o teste destes soros com o Kit ImmunoComb® Leptospira IgG, o que constatou altos títulos de anticorpos.

Levou-nos a crer que a Técnica SAM/MAT não detecta o anticorpo IgG, o que explicava as diferenças no diagnóstico, entre as Técnicas SAM/MAT e o Kit DOT-ELISA ImmunoComb Leptospira IgG.

Em 2019, foi realizada a 3ª investigação. A Biogal, produtora do Kit ImmunoComb Leptospira IgG canina, estava necessitando de soros positivos e negativos para utilizarem no controle da qualidade de sua produção.

O Laboratório Marcos Enrietti (ADAPAR-PR) forneceu estas amostras sendo 100 amostras negativas e 50 positivas na Técnica SAM/MAT.

Solicitamos, no intuito de completar nosso trabalho, que realizassem os testes destas amostras com o Kit ImmunoComb® IgG.

Foram constatados resultados semelhantes aos obtidos cinco anos atrás. Por informação da indústria, muitos soros negativos e com forte suspeita de *Leptospira* apresentavam-se completamente ictericos.

Todas as amostras com suspeita de *Leptospira* que chegam aos laboratórios para realizarem a SAM/MAT, caso ocorra resultado negativo ou suspeito, é solicitado nova amostra dentro de 5 dias.

Inúmeras vezes os soros enviados para novo exame continuavam negativos ou

Antígenos das sorovares estão adsorvidos em um ponto na parte inferior de cada dente do pente. O ponto superior é a referência positiva (figura 3).

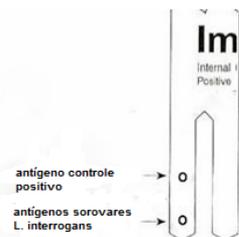


Figura 3. Locais de adsorção do antígeno do controle positivo (ponto superior) e dos antígenos de sorovares de *Leptospira interrogans*.

A primeira etapa do ensaio é depositar amostra de soro ou plasma no poço da linha A da placa de desenvolvimento.

Em seguida, o pente é inserido no poço A que possui a amostra e incubado por 5 minutos. Posteriormente o pente é transferido para os poços restantes (B-F), em intervalos de tempo informados de acordo com o manual de instruções do fabricante (figura 4). Os anticorpos IgG específicos da espécie, se presentes, ligam-se aos antígenos adsorvidos nos pontos do pente.

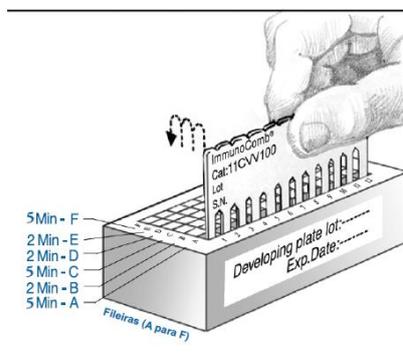


Figura 4. Inserção do pente na placa reveladora e sequência de inserção nos demais poços do kit ImmunoComb®.

A intensidade do resultado de cor corresponde diretamente ao nível de anticorpos na amostra. Os resultados são registrados comparando o ponto de referência positivo (superior) com o ponto do teste (inferior)

A leitura do teste é realizada pela leitora CombCam®.

Os títulos são fornecidos com valores S (scores).

Resultado ImmunoComb®	Interpretação
S0	Negativo
S1	Suspeito
S2	Suspeito
S3	Positivo
S4	Positivo
S5	Positivo
S6	Positivo

Tabela 1. Interpretação dos Scores (S) resultantes do método DOT-Elisa ImmunoComb®.

2. Investigações

2.1 Na primeira investigação, no ano de 2014, foram testados 240 soros caninos provenientes da rotina diagnóstica do Laboratório VP Laboratório de Análises da cidade Curitiba (PR), utilizando as técnicas de soroaglutinação microscópica (com os sorovares *canicola*, *icterohaemorrhagiae*, *grippothyphosa*, *copenhageni*, *wolff* e *pomona*) e DOT-ELISA (ImmunoComb® IgG - Biogal Galed Labs. Israel).

Os soros de cães com histórico compatível com a doença foram enviados ao laboratório por Clínicas Veterinárias e estocados em freezer a -20 °C.

2.2 Na segunda investigação (2016), os pesquisadores da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Paraná (dados não publicados) avaliaram 16 cães da raça Beagle de aproximadamente oito meses de idade. O experimento foi conduzido em ambiente restrito e controlado, sem histórico da doença, estando aparentemente livre da infecção por *leptospira* e os cães mantidos isolados.

Os grupos receberam quatro doses de vacinas comerciais iniciando a primeira aos 45 dias de idade (11/03/2015), a segunda aos 72 dias (07/04/2015), a terceira aos 121 dias de idade (26/05/2015) e, por fim, a quarta vacinação 395 dias após a terceira vacinação (24/06/2016). Para isto foram empregadas bacterinas comerciais inativadas contendo os sorovares *Canicola* e *Icterohaemorrhagiae*.

A colheita das amostras de sangue foi realizada sempre 25 dias após cada vacinação e submetidas ao teste de soroaglutinação microscópica pelo Laboratório Veterinária Preventiva e ao método DOT-Elisa ImmunoComb® pela Biogal Galed Labs.

2.3 Na terceira investigação, 150 amostras de soro de cães com suspeita de leptospirose foram enviadas ao Centro de Diagnóstico *Marcos Enrietti*. Foram testadas frente às técnicas de soroaglutinação microscópica e dot-ELISA ImmunoComb® *Leptospira canina* IgG pela Biogal Galed Labs.

3. Resultados

3.1 Resultados primeira investigação

Das 240 amostras testadas, 111 foram reagentes (46,25%) no teste de soroaglutinação microscópica com titulações maiores ou iguais a 1:100. No método ImmunoComb® o número de amostras positivas foi 202 (84,17%).

Em relação aos sorovares, *icterohaemorrhagiae* foi o mais freqüente entre as amostras, seguido de *canicola* e *copenhageni* (tabela 2). Tesseroli, et al. (2005) investigaram a prevalência da leptospirose em cães da mesma região constatando o sorovar *copenhageni* como o de maior frequência (86,84%) seguido de *canicola* e *icterohaemorrhagiae* com 9,65% e 2,63% respectivamente. Martins, et al. (2013) avaliaram o número de casos da doença em cães nos anos de 2009 e 2010, concluindo que os sorovares em maior frequência foram *canicola* (33,4%) e *icterohaemorrhagiae* (51,4%) respectivamente. Dessa forma, é possível observar uma mudança no cenário epidemiológico da cidade de Curitiba e região metropolitana nos últimos treze anos.

Tabela 1. Detalhamento de todos os 240 soros testados nas técnicas de soroaaglutinação microscópica e DOT-Elisa ImmunoComb®

SORO (N°)	SOROAGLUTINAÇÃO (IgM)						ImmunoComb (IgG)
	Canicola	Ictero	Grippa	Copen	Wolff	Pomona	
1	1:200	1:25	-	-	-	-	S4
2	1:50	-	-	-	-	1:200	S4
3	-	-	-	-	-	-	Negativo
4	1:50	1:100	-	-	-	-	S1
5	-	1:100	-	-	-	-	S1
6	-	1:100	-	-	-	-	S1
7	-	-	-	-	-	-	S1
8	-	1:100	-	-	1:50	-	S1
9	1:100	-	-	-	-	-	Negativo
10	-	1:25	-	-	-	-	Negativo
11	-	-	-	-	-	-	Negativo
12	-	-	-	-	-	-	S1
13	1:100	-	1:200	-	1:50	-	S2
14	1:400	1:100	1:25	-	-	1:100	S5
15	1:200	1:200	1:100	1:50	1:25	-	S2
16	1:50	1:400	1:25	1:400	-	-	S4
17	1:50	1:400	1:200	1:400	-	-	S3
18	1:400	1:50	-	1:50	-	-	S3
19	-	1:200	1:50	1:100	-	-	S1
20	1:50	1:25	-	-	-	-	S2
21	1:25	-	1:25	-	1:25	-	Negativo
22	-	-	-	-	-	-	Negativo
23	1:25	1:25	-	1:25	-	-	Negativo
24	-	-	-	-	-	-	Negativo
25	1:400	1:25	-	1:25	-	-	S3
26	1:100	1:25	-	-	-	-	S3
27	1:50	1:100	-	1:100	-	-	S4
28	-	1:50	-	-	-	-	Negativo
29	-	1:400	-	-	-	1:25	S3
30	1:25	-	-	-	-	-	S2
31	1:50	-	-	1:50	-	-	S1
32	1:25	-	-	-	1:50	-	S2
33	-	-	-	-	-	-	S1
34	-	-	-	-	-	-	S1
35	1:50	-	-	-	-	-	S2

36	-	1:200	-	1:100	-	-	S2
37	1:25	1:100	-	1:50	-	-	S2
38	1:25	-	-	-	1:25	-	S1
39	-	-	-	-	-	-	Negativo
40	1:50	1:50	-	-	-	-	S1
41	1:25	-	-	-	-	1:400	S5
42	-	-	-	-	-	-	S1
43	-	-	-	-	-	-	S1
44	-	-	-	-	-	-	Negativo
45	-	1:100	-	1:50	-	-	S3
46	1:50	1:400	-	1:400	-	-	S4
47	1:400	1:400	-	1:100	-	1:50	S4
48	-	1:100	-	1:50	1:400	-	S5
49	-	1:100	-	1:200	-	-	S4
50	-	1:25	-	-	-	-	Negativo
51	-	1:50	-	-	-	-	S1
52	-	1:50	-	-	-	1:25	S1
53	1:25	1:50	-	-	-	-	S1
54	-	1:25	-	-	-	-	S1
55	-	-	-	-	-	-	Negativo
56	-	1:25	-	-	-	-	S1
57	-	1:400	-	1:100	-	-	S4
58	-	1:50	-	-	-	-	S3
59	1:100	1:50	-	-	-	-	S4
60	1:200	1:100	-	1:50	-	-	S4
61	-	-	-	-	-	-	Negativo
62	-	-	-	-	-	-	S1
63	1:100	1:100	-	-	-	-	S3
64	1:400	1:400	-	-	-	-	S5
65	-	-	-	-	-	-	Negativo
66	-	-	-	-	-	-	Negativo
67	-	1:25	-	-	-	-	S1
68	-	1:50	-	-	-	-	S1
69	1:25	1:100	-	-	1:25	-	S4
70	1:100	1:50	-	-	-	-	S4
71	-	1:50	-	-	1:25	-	S2
72	-	-	-	-	-	-	Negativo
73	-	1:200	-	1:50	-	-	S3
74	1:50	-	-	-	-	-	S1
75	1:25	1:25	-	1:25	-	-	Negativo
76	1:25	1:100	-	-	-	1:50	S3

77	1:25	-	-	-	-	-	S1
78	-	-	-	1:25	-	-	S1
79	-	1:25	-	-	-	-	S3
80	1:25	1:50	-	-	1:25	-	S2
81	-	-	-	-	-	-	Negativo
82	1:200	1:50	-	-	-	1:50	S3
83	1:25	1:25	-	-	-	-	S1
84	-	1:50	-	-	-	-	S1
85	1:25	1:200	-	1:100	-	-	S2
86	1:50	1:400	-	1:50	-	-	S3
87	-	1:25	-	1:25	-	-	S2
88	1:50	1:25	-	-	-	-	S5
89	1:50	1:200	-	1:400	-	-	S5
90	-	1:50	-	-	-	-	S2
91	-	-	-	-	-	-	Negativo
92	-	-	-	-	-	-	S1
93	-	-	-	-	-	-	S1
94	1:100	1:100	-	1:400	-	-	S5
95	1:100	1:200	-	-	-	-	S2
96	-	1:100	-	1:100	-	-	S4
97	-	-	-	-	-	-	Negativo
98	-	-	-	-	-	-	S1
99	1:200	1:100	-	1:25	-	1:100	S4
100	1:25	-	-	-	-	-	S4
101	-	1:25	-	-	-	-	S2
102	1:400	1:200	-	-	-	-	S5
103	1:50	-	-	-	-	-	S1
104	1:100	-	-	-	-	-	S2
105	1:200	1:100	-	1:50	-	-	S4
106	1:50	-	-	1:25	-	1:100	S5
107	-	-	-	-	-	-	Negativo
108	1:50	1:100	-	1:25	-	-	S1
109	-	1:100	-	1:400	-	-	S3
110	-	1:50	-	-	-	-	S1
111	-	-	-	-	-	-	S1
112	1:25	1:25	-	-	-	-	S2
113	1:25	1:25	-	-	-	1:100	S3
114	1:100	1:100	-	1:50	-	-	S3
115	-	-	-	1:50	-	-	S3
116	-	1:400	-	-	-	1:25	S5
117	-	1:100	-	-	-	-	S3

118	-	-	-	-	-	-	Negativo
119	-	1:200	-	1:200	-	-	S5
120	-	1:400	-	1:400	-	-	S3
121	-	1:100	-	-	-	-	S2
122	-	1:50	-	-	-	-	S1
123	-	-	-	1:200	-	-	S3
124	-	1:200	-	-	-	-	S3
125	1:50	-	-	-	-	-	S1
126	-	1:100	-	-	-	-	S1
127	1:100	1:400	-	1:50	-	-	S4
128	1:50	1:200	-	1:100	-	-	S4
129	1:50	1:200	-	1:400	-	-	S5
130	-	1:400	-	1:400	-	-	S4
131	-	1:200	-	1:50	-	-	S4
132	-	1:200	-	1:25	-	-	S3
133	1:50	1:100	-	1:50	1:25	-	S3
134	-	1:100	-	1:50	-	-	S1
135	-	1:400	-	-	-	-	S2
136	1:200	1:400	1:25	1:400	-	-	S5
137	1:200	-	-	1:200	-	-	S3
138	1:100	1:200	-	1:100	-	1:200	S4
139	1:50	1:100	-	1:400	-	-	S3
140	1:25	1:400	-	1:400	-	-	S5
141	1:100	-	-	-	-	-	S1
142	-	1:100	-	1:25	-	-	S1
143	1:25	1:100	-	1:100	-	-	S2
144	1:100	1:400	-	1:400	-	1:25	S5
145	-	1:25	-	-	-	-	S1
146	-	-	-	-	-	-	S4
147	-	-	-	-	-	-	S1
148	-	1:200	-	1:100	-	-	S1
149	1:50	1:400	-	-	-	1:400	S5
150	1:50	1:400	1:25	1:400	-	-	S4
151	-	-	-	-	-	-	Negativo
152	-	-	-	-	-	-	S1
153	-	-	-	-	-	-	Negativo
154	-	-	-	-	-	-	Negativo
155	1:100	1:50	-	-	-	1:25	S1
156	1:200	1:400	-	1:400	-	-	S4
157	-	-	-	-	-	-	Negativo
158	1:50	1:25	-	-	-	-	S1

159	1:25	-	-	-	-	-	S3
160	1:100	1:50	-	-	-	1:100	S5
161	-	-	-	-	-	-	S1
162	-	-	-	-	1:25	-	S2
163	-	1:50	-	1:25	-	-	S1
164	-	-	-	-	-	-	S2
165	-	-	-	1:25	-	-	S3
166	1:50	-	-	-	-	-	S1
167	1:50	1:200	-	-	1:25	1:25	S2
168	1:25	1:200	-	1:50	-	-	S3
169	-	-	-	-	-	-	S2
170	-	-	-	-	-	-	S1
171	-	-	-	-	-	-	S1
172	-	1:400	-	1:50	-	-	S2
173	-	1:50	-	1:25	-	-	S1
174	-	-	-	-	-	-	Negativo
175	1:50	1:400	-	1:200	-	-	S3
176	1:25	1:50	-	-	-	-	S4
177	1:50	-	-	-	-	-	S3
178	-	-	-	-	-	-	Negativo
179	1:50	1:50	-	1:25	-	-	S1
180	1:50	1:25	-	1:50	-	-	S4
181	1:25	1:25	-	-	-	-	S2
182	1:25	1:25	-	-	-	-	S2
183	-	-	-	-	-	-	Negativo
184	-	-	-	-	-	-	Negativo
185	-	-	-	-	-	-	Negativo
186	-	-	-	-	-	-	Negativo
187	-	1:400	-	1:400	-	-	S5
188	-	1:400	-	1:200	-	-	S5
189	-	1:25	-	-	-	-	S2
190	-	-	-	-	-	-	Negativo
191	-	1:25	-	-	-	-	S1
192	-	-	-	1:50	-	-	S4
193	-	-	-	-	-	-	Negativo
194	-	-	-	-	-	-	S1
195	-	1:400	-	1:400	-	-	S5
196	-	1:50	-	1:200	-	-	S4
197	-	-	-	-	-	-	Negativo
198	-	1:50	-	-	-	-	S3
199	-	-	1:100	1:100	-	-	S5

200	-	-	-	-	-	-	S1
201	-	1:100	-	1:200	-	-	S1
202	-	-	-	-	-	-	Negativo
203	-	-	-	-	-	-	S1
204	-	-	-	-	-	-	S1
205	-	1:400	1:100	1:400	-	-	S4
206	-	1:400	-	1:200	-	-	S3
207	-	1:400	-	1:100	-	-	S3
208	-	-	-	-	-	-	S1
209	1:25	1:200	-	-	-	-	S3
210	-	-	-	-	-	-	S1
211	1:25	-	-	-	-	-	S1
212	-	1:400	1:50	1:400	-	-	S5
213	-	1:200	-	1:200	-	-	S4
214	-	1:100	-	1:25	-	-	S1
215	1:100	1:100	-	1:400	-	-	S3
216	1:200	1:400	-	1:400	-	-	S4
217	-	1:100	1:400	1:100	-	-	S4
218	1:50	1:400	1:25	1:400	-	-	S5
219	-	1:400	-	1:400	-	-	S4
220	1:50	1:400	-	1:400	-	-	S4
221	1:50	1:400	-	-	-	-	S4
222	-	-	-	-	-	-	S1
223	1:50	-	-	-	-	-	S2
224	-	-	-	-	-	-	Negativo
225	1:100	1:50	-	-	-	-	S3
226	-	1:400	-	1:400	-	-	S3
227	1:25	-	-	-	-	-	S1
228	1:200	1:100	-	1:400	-	-	S5
229	-	-	-	-	-	-	S2
230	-	-	-	-	-	-	S1
231	1:25	1:400	1:200	1:400	-	-	S5
232	-	-	-	-	-	-	S1
233	-	1:50	-	-	-	-	S1
234	-	-	-	-	-	-	S1
235	-	-	-	-	-	-	S1
236	-	1:25	-	-	-	-	S1
237	1:25	-	-	-	-	-	S1
238	-	-	-	-	-	-	S1
239	-	-	-	-	-	-	S1
240	1:50	-	-	-	-	-	S3

Tabela 2. Amostras que obtiveram resultado positivo (>1:100) na Soroaglutinação Microscópica e seus respectivos resultados no método DOT-Elisa ImmunoComb® IgG.

SORO (N°)	Soroaglutinação Microscópica IgM	DOT-Elisa ImmunoComb® (IgG)
1	Reagente (1:200) IgM	Positivo S4 IgG
2	Reagente (1:200) IgM	Positivo S4
4	Reagente (1:100)	Suspeito S1
5	Reagente (1:100)	Suspeito S1
6	Reagente (1:100)	Suspeito S1
8	Reagente (1:100)	Suspeito S1
9	Reagente (1:100)	Negativo
13	Reagente (1:200)	Suspeito S2
14	Reagente (1:400)	Positivo S5
15	Reagente (1:200)	Suspeito S2
16	Reagente (1:400)	Positivo S4
17	Reagente (1:400)	Positivo S3
18	Reagente (1:400)	Positivo S3
19	Reagente (1:200)	Suspeito S1
25	Reagente (1:400)	Positivo S3
26	Reagente (1:100)	Positivo S3
27	Reagente (1:100)	Positivo S4
29	Reagente (1:400)	Positivo S3
36	Reagente (1:200)	Suspeito S2
37	Reagente (1:100)	Suspeito S2
41	Reagente (1:400)	Positivo S5
45	Reagente (1:100)	Positivo S3
46	Reagente (1:400)	Positivo S4
47	Reagente (1:400)	Positivo S4
48	Reagente (1:100)	Positivo S5
49	Reagente (1:100)	Positivo S4
57	Reagente (1:400)	Positivo S4
59	Reagente (1:100)	Positivo S4
60	Reagente (1:200)	Positivo S4
63	Reagente (1:100)	Positivo S3
64	Reagente (1:100)	Positivo S5
69	Reagente (1:100)	Positivo S4
70	Reagente (1:100)	Positivo S4
73	Reagente (1:200)	Positivo S3
76	Reagente (1:100)	Positivo S3

82	Reagente (1:200)	Positivo S3
85	Reagente (1:200)	Suspeito S2
86	Reagente (1:400)	Positivo S3
89	Reagente (1:400)	Positivo S5
94	Reagente (1:100)	Positivo S5
95	Reagente (1:200)	Suspeito S2
96	Reagente (1:100)	Positivo S4
99	Reagente (1:200)	Positivo S4
102	Reagente (1:400)	Positivo S5
104	Reagente (1:100)	Suspeito S2
105	Reagente (1:200)	Positivo S4
106	Reagente (1:100)	Positivo S5
108	Reagente (1:100)	Suspeito S1
109	Reagente (1:400)	Positivo S3
113	Reagente (1:100)	Positivo S3
114	Reagente (1:100)	Positivo S3
116	Reagente (1:400)	Positivo S5
117	Reagente (1:100)	Positivo S3
119	Reagente (1:200)	Positivo S5
120	Reagente (1:400)	Positivo S3
121	Reagente (1:100)	Suspeito S2
123	Reagente (1:200)	Positivo S3
124	Reagente (1:200)	Positivo S3
126	Reagente (1:100)	Suspeito S1
127	Reagente (1:400)	Positivo S4
128	Reagente (1:200)	Positivo S4
129	Reagente (1:200)	Positivo S5
130	Reagente (1:400)	Positivo S4
131	Reagente (1:200)	Positivo S4
132	Reagente (1:200)	Positivo S3
133	Reagente (1:100)	Positivo S3
134	Reagente (1:100)	Suspeito S1
135	Reagente (1:400)	Suspeito S2
136	Reagente (1:400)	Positivo S5
137	Reagente (1:200)	Positivo S3
138	Reagente (1:200)	Positivo S4
139	Reagente (1:400)	Positivo S3
140	Reagente (1:400)	Positivo S5

141	Reagente (1:100)	Suspeito S1
142	Reagente (1:100)	Suspeito S1
143	Reagente (1:100)	Suspeito S2
144	Reagente (1:400)	Positivo S5
148	Reagente (1:200)	Suspeito S1
149	Reagente (1:400)	Positivo S5
150	Reagente (1:400)	Positivo S4
155	Reagente (1:100)	Suspeito S1
156	Reagente (1:400)	Positivo S4
160	Reagente (1:100)	Positivo S5
167	Reagente (1:200)	Suspeito S2
168	Reagente (1:200)	Positivo S3
172	Reagente (1:400)	Suspeito S2
175	Reagente (1:400)	Positivo S3
187	Reagente (1:400)	Positivo S5
188	Reagente (1:400)	Positivo S5
195	Reagente (1:400)	Positivo S5
196	Reagente (1:200)	Positivo S4
199	Reagente (1:100)	Positivo S5
201	Reagente (1:200)	Suspeito S1
205	Reagente (1:400)	Positivo S4
206	Reagente (1:400)	Positivo S3
207	Reagente (1:400)	Positivo S3
209	Reagente (1:200)	Positivo S3
212	Reagente (1:400)	Positivo S5
213	Reagente (1:200)	Positivo S4
214	Reagente (1:100)	Suspeito S1
215	Reagente (1:100)	Positivo S3
216	Reagente (1:400)	Positivo S4
217	Reagente (1:400)	Positivo S4
218	Reagente (1:400)	Positivo S5
219	Reagente (1:400)	Positivo S4
220	Reagente (1:400)	Positivo S4
221	Reagente (1:400)	Positivo S4
225	Reagente (1:100)	Positivo S3
226	Reagente (1:400)	Positivo S3
228	Reagente (1:400)	Positivo S5
231	Reagente (1:400)	Positivo S5

Tabela 3. Amostras classificadas como suspeitas (1:25 e 1:50) na Soroaglutinação Microscópica e seus respectivos resultados no método DOT-Elisa ImmunoComb® IgG.

SORO (N°)	Soroaglutinação Microscópica IgM	DOT-Elisa ImmunoComb® (IgG)	SORO (N°)	Soroaglutinação Microscópica IgM	DOT-Elisa ImmunoComb® (IgG)
10	Suspeito (1:25) IgM	Negativo	101	Suspeito (1:25)	Suspeito S2 IgG
20	Suspeito (1:50) IgM	Suspeito S2 IgG	103	Suspeito (1:50)	Suspeito S1 IgG
21	Suspeito (1:25) IgM	Negativo	110	Suspeito (1:50)	Suspeito S1 IgG
23	Suspeito (1:25) IgM	Negativo	112	Suspeito (1:25)	Suspeito S2 IgG
28	Suspeito (1:50) IgM	Negativo	115	Suspeito (1:50)	Positivo S3 IgG
30	Suspeito (1:25) IgM	Suspeito S2 IgG	122	Suspeito (1:50)	Suspeito S1 IgG
31	Suspeito (1:50) IgM	Suspeito S1 IgG	125	Suspeito (1:50)	Suspeito S1 IgG
32	Suspeito (1:50) IgM	Suspeito S2 IgG	145	Suspeito (1:25)	Suspeito S1 IgG
35	Suspeito (1:50) IgM	Suspeito S2 IgG	158	Suspeito (1:50)	Suspeito S1 IgG
38	Suspeito (1:25) IgM	Suspeito S1 IgG	159	Suspeito (1:25)	Positivo S3 IgG
40	Suspeito (1:50) IgM	Suspeito S1 IgG	162	Suspeito (1:25)	Suspeito S2 IgG
50	Suspeito (1:25) IgM	Negativo	163	Suspeito (1:50)	Suspeito S1 IgG
51	Suspeito (1:50) IgM	Suspeito S1 IgG	165	Suspeito (1:25)	Positivo S3 IgG
52	Suspeito (1:50) IgM	Suspeito S1 IgG	166	Suspeito (1:50)	Suspeito S1 IgG
53	Suspeito (1:50) IgM	Suspeito S1 IgG	173	Suspeito (1:50)	Suspeito S1 IgG
56	Suspeito (1:25) IgM	Suspeito S1 IgG	176	Suspeito (1:50)	Positivo S4 IgG
58	Suspeito (1:50) IgM	Positivo S3 IgG	177	Suspeito (1:50)	Positivo S3 IgG
67	Suspeito (1:25) IgM	Suspeito S1 IgG	179	Suspeito (1:50)	Suspeito S1 IgG
68	Suspeito (1:50) IgM	Suspeito S1 IgG	180	Suspeito (1:50)	Positivo S4 IgG
71	Suspeito (1:50) IgM	Suspeito S2 IgG	181	Suspeito (1:25)	Suspeito S2 IgG
74	Suspeito (1:50) IgM	Suspeito S1 IgG	182	Suspeito (1:25)	Suspeito S2 IgG
75	Suspeito (1:25) IgM	Negativo	189	Suspeito (1:25)	Suspeito S2 IgG
77	Suspeito (1:25) IgM	Suspeito S1 IgG	191	Suspeito (1:25)	Suspeito S1 IgG
78	Suspeito (1:25) IgM	Suspeito S1 IgG	192	Suspeito (1:50)	Positivo S4 IgG
79	Suspeito (1:25) IgM	Positivo S3 IgG	198	Suspeito (1:50)	Positivo S3 IgG
80	Suspeito (1:50) IgM	Suspeito S2 IgG	211	Suspeito (1:25)	Suspeito S1 IgG
83	Suspeito (1:25) IgM	Suspeito S1 IgG	223	Suspeito (1:50)	Suspeito S2 IgG
84	Suspeito (1:50) IgM	Suspeito S1 IgG	227	Suspeito (1:25)	Suspeito S1 IgG
87	Suspeito (1:25) IgM	Suspeito S2 IgG	233	Suspeito (1:50)	Suspeito S1 IgG
88	Suspeito (1:50) IgM	Positivo S5 IgG	236	Suspeito (1:25)	Suspeito S1 IgG
90	Suspeito (1:50) IgM	Suspeito S2 IgG	237	Suspeito (1:25)	Suspeito S1 IgG
100	Suspeito (1:25) IgM	Positivo S4 IgG	240	Suspeito (1:50)	Positivo S3 IgG

Tabela 4. Amostras negativas na reação de Soroaglutinação Microscópica e seus respectivos resultados no método DOT-Elisa ImmunoComb® IgG.

SORO (Nº)	Soroaglutinação Microscópica	DOT-Elisa ImmunoComb® (IgG)
3	Negativo (-)	Negativo
7	Negativo (-)	Suspeito S1 IgG
11	Negativo (-)	Negativo
12	Negativo (-)	Suspeito S1 IgG
22	Negativo (-)	Negativo
24	Negativo (-)	Negativo
33	Negativo (-)	Suspeito S1 IgG
34	Negativo (-)	Suspeito S1 IgG
39	Negativo (-)	Negativo
42	Negativo (-)	Suspeito S1 IgG
43	Negativo (-)	Suspeito S1 IgG
44	Negativo (-)	Negativo
54	Negativo (-)	Suspeito S1 IgG
55	Negativo (-)	Negativo
61	Negativo (-)	Negativo
62	Negativo (-)	Suspeito S1 IgG
65	Negativo (-)	Negativo
66	Negativo (-)	Negativo
72	Negativo (-)	Negativo
81	Negativo (-)	Negativo
91	Negativo (-)	Negativo
92	Negativo (-)	Suspeito S1 IgG
93	Negativo (-)	Suspeito S1 IgG
97	Negativo (-)	Negativo

98	Negativo (-)	Suspeito S1 IgG
107	Negativo (-)	Negativo
111	Negativo (-)	Suspeito S1 IgG
118	Negativo (-)	Negativo
146	Negativo (-)	Reagente S4 IgG
147	Negativo (-)	Suspeito S1 IgG
151	Negativo (-)	Negativo
152	Negativo (-)	Suspeito S1 IgG
153	Negativo (-)	Negativo
154	Negativo (-)	Negativo
157	Negativo (-)	Negativo
161	Negativo (-)	Suspeito S1 IgG
164	Negativo (-)	Suspeito S2 IgG
169	Negativo (-)	Suspeito S2 IgG
170	Negativo (-)	Suspeito S1 IgG
171	Negativo (-)	Suspeito S1 IgG
174	Negativo (-)	Negativo
178	Negativo (-)	Negativo
183	Negativo (-)	Negativo
184	Negativo (-)	Negativo
185	Negativo (-)	Negativo
186	Negativo (-)	Negativo
190	Negativo (-)	Negativo
193	Negativo (-)	Negativo
194	Negativo (-)	Suspeito S1 IgG
197	Negativo (-)	Negativo
200	Negativo (-)	Suspeito S1 IgG

202	Negativo (-)	Negativo
203	Negativo (-)	Suspeito S1 IgG
204	Negativo (-)	Suspeito S1 IgG
208	Negativo (-)	Suspeito S1 IgG
210	Negativo (-)	Suspeito S1 IgG
222	Negativo (-)	Suspeito S1 IgG
224	Negativo (-)	Negativo
229	Negativo (-)	Suspeito S2 IgG
230	Negativo (-)	Suspeito S1 IgG
232	Negativo (-)	Suspeito S1 IgG
234	Negativo (-)	Suspeito S1 IgG
235	Negativo (-)	Suspeito S1 IgG
238	Negativo (-)	Suspeito S1 IgG
239	Negativo (-)	Suspeito S1 IgG

Tabela 5. Resultado das amostras de soro submetidas aos testes de soroaglutinação microscópica ImmunoComb® da primeira investigação (ano 2014)

POSITIVOS

Soroaglutinação Microscópica		DOT-Elisa Immunocomb® (IgG)	
Positivos IgM	111	Positivos IgG	84
Suspeitos (1:25)	0	Suspeitos S2 IgG	12
Suspeitos (1:50)	0	Suspeitos S1 IgG	14
Negativos	0	Negativos	1
Total	111	Total	111

NEGATIVOS

Soroaglutinação Microscópica		DOT-Elisa Immunocomb® (IgG)	
Positivos	0	Positivos IgG	1
Suspeitos (1:25)	0	Suspeitos S2 IgG	3
Suspeitos (1:50)	0	Suspeitos S1 IgG	30
Negativos	65	Negativos	31
Total	65	Total	65

SUSPEITOS

Soroaglutinação Microscópica		DOT-Elisa Immunocomb® (IgG)	
Positivos	0	Positivos IgG	13
Suspeitos (1:25) IgM	29	Suspeitos S2 IgG	15
Suspeitos (1:50) IgM	35	Suspeitos S1 IgG	30
Negativos	0	Negativos	6
Total	64	Total	64

3.2 Resultados da 2ª investigação

Durante o período que antecedeu o início da 2ª investigação, os cães receberam três doses de vacinas comerciais seguindo o protocolo convencional de vacinação sendo a primeira aos 45 dias de idade (11/03/2015), a segunda aos 72 dias (07/04/2015) e a terceira aos 121 dias de idade (26/05/2015). Vinte e cinco dias após cada vacinação, foram coletados sangue e realizado o teste SAM e o ELISA ImmunoComb®.

Soro	1ª colheita (25 dias após-1ª vacinação)*			2ª colheita (25 dias após-2ª vacinação)**			3ª colheita (25 dias após-3ªvacinação)***		
	Ictero	Canicola	ImmunoComb	Ictero	Canicola	ImmunoComb	Ictero	Canicola	ImmunoComb
1	0	50	0	0	25	1	0	25	3
2	0	0	0	0	0	1	0	0	3
3	0	0	0	25	0	1	25	0	5
4	0	50	0	0	0	1	0	0	4
5	0	50	0	0	0	1	0	0	4
6	0	25	0	0	0	2	0	0	5
7	0	100	0	0	0	2	0	0	5
8	0	0	0	0	0	3	0	0	5
9	0	100	0	0	0	0	0	0	5
10	0	25	1	25	0	3	0	0	4
11	0	0	0	0	0	2	0	0	5
12	0	50	0	0	0	1	0	0	5
13	0	50	0	0	0	1	0	0	5
14	0	50	0	0	0	1	0	0	5
15	25	50	0	0	0	2	0	0	5
16	0	0	0	0	0	2	0	0	5

Tabela 7. Resultados obtidos dos testes de soroprecipitação microscópica e DOT-Elisa ImmunoComb® após colheitas de amostras de soro de cães vacinados

Legenda:

**Passados 52 dias da primeira vacinação, os resultados sorológicos da SAM, parecem ter “desaparecido” com exceção verificada nas amostras 1, 2 e 10. Normalmente com um reforço vacinal, os títulos tenderiam a subir e não desaparecer. Os títulos de anticorpos IgG no ImmunoComb® resultaram em *scores* de 1 a 3.

***Passados 101 dias da última vacinação, os resultados sorológicos da SAM desapareceram por completo, com exceção verificada nos soros 1 e 2. Os anticorpos IgG do ImmunoComb após a 3ª vacinação, deram resultados com títulos altos, indicando a quantidade de IgG esperada após a 3ª vacinação. Sugere então que não há anticorpos IgM contra estes 2 sorovares.

3.3 Resultados da 3ª investigação

Tabela 7. Cinquenta amostras POSITIVAS de soro na soroglutinação microscópica SAM(IgM) e seus respectivos resultados no kit ImmunoComb(IgG)

	Amostra	IMMUNOCOMB SCORES IgG	Ictero haem'	Copenhag eni	Castelon is	Pomo na	Autum nalis	Canico la	Gripp o	Cyno pteri	Pyroge nes
1	1323/19	3	1:800	1:800							
2	795/19	5	1:400	1:400							
3	546/19	4	1:200	1:200				1:200			
4	8013/18	4						1:400			
5	6988/18	4	1:1600	1:1600							
6	6744/18	5						1:200			1:800
7	6439/18	5	1:200	1:200							
8	6043/18	5	1:800	1:1600		1:200					
9	5552/18	5	1:400	1:200							
10	5332/18	5	1:200	1:400				1:100			
11	4419/18	4	1:400	1:400				1:400			
12	3970/18	4			1:400		1:800	1:800			
13	3906/18	3	1:800	1:800				1:400			
14	3386/18	5	1:800	1:800				1:400			
15	2978/18	5	1:800	1:800				1:200			
16	1528/18	4	1:100			1:400					
17	1499/18	4	1:400	1:200							1:100
18	984/18	5	1:1600	1:1600							
19	983/18	3	1:200	1:200							
20	850/18	4							1:800	1:200	
21	750/18	5	1:800	1:400							
22	122/18	4	1:800	1:400					1:400		
23	5437/17	3	1:400				1:100		1:100	1:100	
24	5389/17	4	1:400				1:100				
25	5364/17	4	1:400				1:100				
26	5262/17	5	1:100	1:100	1:400				1:400		
27	5225/17	4	1:400	1:400							
28	4509/17	5	1:800	1:400							
29	4263/17	3	1:800	1:400							
30	4257/17	5	1:200	1:100			1:400	1:100			
31	4219/17	4	1:800	1:800							
32	4173/17	5	1:1600	1:1600				1:1600			1:1600
33	4051/17	Suspeito S1	1:800	1:400							
34	3685/17	Suspeito S2	1:400	1:200							
35	3684/17	Suspeito S2	1:800	1:400	1:400						
36	3683/17	4	1:800	1:400	1:400	1:100	1:100	1:100			
37	3657/17	3							1:1600	1:800	
38	3348/17	Suspeito S2	1:100	1:100		1:100			1:800	1:400	
39	3165/17	3						1:100	1:400	1:100	
40	3119/17	5			1:200	1:100	1:100		1:800		
41	2770/17	5	1:1600	1:800							
42	2724/17	5	1:800	1:400							
43	2213/17	4	1:800	1:400							
44	1916/17	5	1:800	1:800							1:400
45	1889/17	5							1:400		
46	1453/17	4							1:400		
47	1407/17	5				1:400	1:800		1:400	1:200	
48	322/17	4	1:200	1:400							
49	152/17	4	1:400				1:400				
50	028/17	4					1:400				

Tabela 8. Cem amostras de soro NEGATIVAS na soroaglutinação microscópica - SAM e seus respectivos resultados no kit ImmunoComb.

identificação	ImmunoComb scores IgG
51	Suspeito S1
52	Positivo S3
53	negativo
54	Positivo S3
55	Suspeito S2
56	Suspeito S1
57	Suspeito S2
58	Suspeito S1
59	negativo
60	Suspeito S1
61	Positivo S3
62	negativo
63	negativo
64	negativo
65	negativo
66	negativo
67	Suspeito S1
68	negativo
69	Suspeito S1
70	Positivo S3
71	Positivo S3
72	Positivo S4
73	Suspeito S1
74	Suspeito S2
75	negativo
76	Suspeito S1
77	negativo
78	negativo
79	negativo
80	negativo
81	Suspeito S1
82	negativo
83	negativo
84	Suspeito S1
85	Suspeito S1
86	negativo
87	Suspeito S2
88	Suspeito S1
89	Positivo S3
90	Positivo S3
91	Positivo S4
92	Suspeito S2
93	Positivo S3
94	negativo
95	negativo
96	negativo
97	Positivo S3
98	Suspeito S1
99	negativo
100	Suspeito S2

identificação	ImmunoComb scores IgG
101	Suspeito S2
102	Positivo S3
103	negativo
104	negativo
105	Suspeito S2
106	negativo
107	Positivo S4
108	Positivo 5
109	Suspeito S2
110	Suspeito S2
111	Positivo S3
112	Positivo S4
113	Positivo S4
114	Positivo S5
115	Suspeito S1
116	Positivo S4
117	negativo
118	negativo
119	Positivo S5
120	Suspeito S2
121	Positivo S5
122	Positivo S3
123	Positivo S4
124	Suspeito S1
125	Suspeito S1
126	Positivo S3
127	negativo
128	Positivo S4
129	Suspeito S1
130	Positivo S3
131	Positivo S3
132	Suspeito S2
133	negativo
134	Positivo S4
135	Suspeito S1
136	Positivo S4
137	Suspeito S1
138	negativo
139	Suspeito S2
140	Suspeito S1
141	Positivo S3
142	Positivo S3
143	Suspeito S1
144	Suspeito S1
145	Positivo S4
146	Suspeito 2
147	Suspeito S1
148	negativo
149	Positivo S5
150	Suspeito S2

Tabelas 9. Resultado das amostras de soro submetidas aos testes de soroaglutinação microscópica e ImmunoComb® da terceira investigação

50 soros positivos, fornecidos pelo Lab Marcos Enrietti (ano 2019) Técnica (SAM/MAT)

Soroaglutinação Microscópica	Positivo IgM	50	ImmunoComb®	Positivo IgG	46
	Suspeito	0		Suspeito S2 IgG	3
	Suspeito	0		Suspeito S1 IgG	1
Total		50	Total		50

100 soros negativos fornecidos pelo Laboratório Marcos Enrietti (2019) Técnica (SAM/MAT)

Soroaglutinação Microscópica	Negativo	100	ImmunoComb®	Negativo	29
	Positivo			Positivo S5 IgG	5
	Positivo			Positivo S4 IgG	11
	Positivo			Positivo S3 IgG	17
	Suspeito	0		Suspeito S2 IgG	15
	Suspeito	0		Suspeito S1 IgG	23
Total		100	Total		100

4. Discussão

Nossa suspeita, é de que os anticorpos IgG são de difícil detecção na SAM, devido ao seu baixo poder aglutinante. É importante ressaltar também que a imunoglobulina M possui maior eficiência na ação de aglutinação devido aos sítios de ligação do antígeno, já a imunoglobulina G, a qual surge logo após a IgM, é mais eficiente na atividade neutralizante e na fagocitose. “Os dados acima relatados nos levam a crer também, que na técnica SAM, quando o soro é constituído por IgM, ocorre uma malha de aglutinação constituída do antígeno leptospira e o anticorpo IgM, que possibilita ao técnico a visualização no microscópio desta malha e assim possibilitando o diagnóstico.

Já, soros constituídos de anticorpos IgG podem ou não aglutinar com a consequente formação da malha, porém não visível devido ao tamanho da IgG. Pode também não ocorrer aglutinação devido ao pH da reação, pois a aglutinação entre IgG e o antígeno in vitro é melhor percebida em pH acidificado.” (Agottani, 2019, comunicação pessoal).

A IgG também apresenta tempo de vida

maior comparada à IgM, e assim, persiste por um tempo maior no sangue do animal (VAN BEKKUN, 1966; HOOD et al., 1978; ARDUINO, 2005). No caso de pacientes com doença crônica, a SAM apresenta baixa eficiência tanto na detecção de hospedeiros de manutenção como na determinação do grau de imunidade à infecção, pois o uso de vacinas promove o aumento do nível sérico de anticorpos IgG com títulos de 1:100 a 1:400. Esta imunidade persiste normalmente por um longo intervalo de tempo em animais vacinados, mesmo após resultado negativo na SAM (BLOOD; RADOSTITS, 2002).

Tuermers et al. (2013) observaram alta sensibilidade (98%) e especificidade (97%) no ImmunoComb®, porém os autores não relatam se o resultado S1 foi considerado como reagente para leptospirose (fraco positivo) como ocorre nas instruções de uso do kit ou suspeito.

Um estudo realizado por Odontsetseg, Sakado et al. (2005) demonstrou que o kit ImmunoComb® possui eficiência satisfatória quando comparado com resultados obtidos no SAM, sugerindo um potencial substituto na rotina laboratorial devido sua rapidez, sensibilidade e a não necessidade de manipular culturas vivas de *Leptospira*, diminuindo o risco de infecção.

Hartmann et al. (1984) realizaram estudo comparativo entre a SAM, ELISA IgM e ELISA IgG para avaliar a resposta vacinal ao sorovar *canicola* em cães da raça Beagle utilizando bacterina específica para este sorovar. Os autores observaram um significativo aumento no nível de anticorpos IgG pelo método de ELISA após reforço anual. O monitoramento dos animais revelou que o nível de IgG permaneceu adequado por um período de 1 ano. Já, a resposta avaliada pela SAM foi semelhante ao teste de ELISA IgM apresentando uma queda nos níveis desta imunoglobulina em apenas sete semanas. Os autores concluíram que a resposta imune à bacterina é de difícil detecção pelo método da SAM pois os animais vacinados podem desenvolver baixos títulos de anticorpos aglutinantes.

A partir dessas informações, é possível explicar o aumento no número de amostras positivas no ImmunoComb® quando comparado à SAM. Esta última possui limitações na detecção de anticorpos IgG, seja por infecções crônicas, animais de manutenção, ou vacinados contra leptospirose. Assim, o kit ImmunoComb® torna-se de suma importância para no clínico na investigação de resposta vacinal ou de tratamento no caso de pacientes com ou sem sintomatologia aparente.

Segundo Ojhaa, et al (2018), o kit ImmunoComb® é mais sensível quando

comparado à técnica de soroaglutinação microscópica apesar de que não há identificação de qual sorovar está reagindo. Dessa forma, não há possibilidade de se obter resposta específica sobre qual sorovar o paciente está realmente protegido.

Os dados obtidos revelam que, apesar de algumas amostras apresentarem resultados negativos na SAM, podem essas pertencer a pacientes em estado de portadores crônicos com leptospirose que pode perdurar por meses a anos. Este é um preocupante fator de transmissão da doença para o homem (TREVEJO, et al., 1998; NATAREKASEENIVASAN, et al., 2002; JOHNSON, et al., 2004).

5. Conclusão

O diagnóstico da leptospirose por meio da técnica dot-ELISA possui confiabilidade no diagnóstico da doença e pode ser de grande utilidade na rotina diagnóstica. O método é simples, rápido e não requer equipamentos complexos, gerando baixo custo aos laboratórios e suprimindo a necessidade de algumas localidades carentes de laboratórios veterinários.

Cães, com sintomas e altos títulos no ImmunoComb leptospira IgG, podem ser avaliados a urina, pela técnica do PCR, para pesquisar leptospirose.

6. Referências

01. Abdoel, T.H., et al., 2011. Rapid test for the serodiagnosis of acute canine leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, 12;150(1-2):211-3
02. Addie, D. D., et al., 2014. The utility of feline coronavirus antibody tests. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, 17(2), 152-162.
03. Adler, B., et al., 1980. Detection of specific anti-leptospiral immunoglobulins in human serum by solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Clinical Microbiology**, 11 (5), 452-457.
04. Adler, B., Moctezuma, A.P., 2010. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, 140, 287-296.
05. Arduino, G. G. C. Títulos de anticorpos aglutinantes induzidos por vacinas comerciais contra leptospirose bovina. Tese (doutorado) 131 páginas.
06. Azevedo, S. S. et al., 2011. Ocorrência e fatores de risco associados à leptospirose em cães atendidos em hospital veterinário no semiárido paraibano. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. 48 (2), 161-166.
07. Bacallão, J., et al., 2004. Socioeconomic factors and vulnerability to outbreaks of leptospirosis in Nicaragua. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 11, 8301-8318.
08. Barthi, A. R., et al., 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Infectious Diseases**, 3, 757-771.
09. BLOOD, D. C.; RADOSTITS, O. M. Clínica Veterinária. ed. 9ª. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A. 2002. p. 637-646
10. Bojanich, M. V., et al., 2012. An evaluation of the dot-ELISA procedure as a diagnostic test in an area with a high prevalence of human *Toxocara canis* infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 107(2), 194-197.
11. Bomfim, M. R. Q., Ko, A., Koury, M. C., 2005. Evaluation of the recombinant LipL32 in enzyme-linked

- immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, 109 (1-2),89-94.
12. Bolin, C., 1996. Diagnosis of leptospirosis: an emerging disease of companion animals. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animals)**, 11,166–171.
 13. Cole, J.R., Sulzer, C.R., Pursell, A.R.,1973. Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test. **Applied Microbiology**, 25,976-980. Desakorn, V., et al., 2012. Accuracy of a commercial IgM ELISA for the diagnosis of human leptospirosis in Thailand. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 86 (3), 524-527.
 14. Dhliwayo,S., et al., 2012. Seroprevalence of leptospirosis in dogs in urban Harare and selected rural communities in Zimbabwe. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, 79,1-6.
 15. Dias J.P., et al., 2007. Factors associated with *Leptospira sp* infection in a large urban center in northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 40 (5),499-504.
 16. Effler, P.V., et al., 2002. Evaluation of eight rapid screening tests for acute leptospirosis in Hawaii. **Journal of Clinical Microbiology**, 40 (4),1464-1469.
 17. Fernandes, A.R.F., et al. 2013. Soroepidemiologia da leptospirose canina na região metropolitana de Natal, estado do Rio Grande do Norte. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 50 (3),226-232.
 18. Galton et al., 1965. Application of a microtechnique to the agglutination test for leptospiral antibodies. **Applied Microbiology**, 13,81-85.
 19. Gressler, M.A., et al. 2012. Leptospirose e exposição ocupacional: um estudo no município de Santa Cruz do Sul/RS. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, 2 (2),51-54.
 20. Gonçalves, D.D., et al., 2011. Leptospirose em cão errante da região noroeste do Estado do Paraná – relato de caso. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, 14 (1),77-79
 21. Györke, A., et al., 2011. *Toxoplasma gondii* in Romanian household cats: Evaluation of serological tests, epidemiology and risk factors. **Preventive Veterinary Medicine**, 102,321-328.
 22. HARTMAN, E.G. et al. Humoral immune response of dogs after vaccination against leptospirosis measured by an IgM- and IgG-specific ELISA. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Volume 7 (3-4), p. 245-254. 1984
 23. Hood, L.E., Weissman, I.L., Wood, W.B., 1978. **Immunology**. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., Menlo Park, California.
 24. Johnson, M.A.S., Smith, H., et al., 2004. Environmental exposure and leptospirosis, Peru. **Emerging Infectious Diseases**, 10 (6), 1016-1022.
 25. Lilenbaum, W., et al., 2005. Leptospiral antibodies in captive lion tamarins (*Leontopithecus*) in Brazil. **The Veterinary Journal**. 169,462-464.
 26. Martins, M.C., et al., 2013. Incidence of canine leptospirosis in the metropolitan area of Curitiba, State of Paraná, Southern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 46 (6),772-775.
 27. Mende, K., et al., 2014. Evaluation of an in-house dot enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against feline panleukopenia virus. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, in press. Disponível em <<http://jfm.sagepub.com/content/early/2014/07/03/1098612X14520812.long>>. Acesso em 1 de setembro de 2014.
 28. Miyazato, K.E., et al., 2013. Incidence of leptospirosis infection in the east zone of Sao Paulo City, Brazil. **International Archives of Medicine**. 23 (6),2-7.
 29. Navasco, N.B., et al., 2007. Diagnóstico de leptospirosis: evaluación de um enzimoimmuno ensayo em fase sólida em diferentes etapas de La enfermedad. **Revista Panamericana Del Salud Publica**, 21 (6), 388-395.
 30. Natarejaseenivasan, K., Boopalan M., Selvanayaki, K., Suresh, S.R., Ratnam, S., 2002. Leptospirosis among rice mill workers of Salem, South India. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, 55 (5), 170-173.
 31. Odontsetseg, N., Sakado, Y., Kida, H., 2005. Serological surveillance of canine leptospirosis in Mongolia. **Veterinary Record**, 157 (4),120-121.
 32. Ojha, K, Singh, D, Kaphle, K, Shah, Y, Pant, D, 2018. Sero-prevalence of leptospirosis and differentiation in blood parameters between positive and negative cases in dogs of Kathmandu Valley. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 112 (8): 378-382.
 33. OIE. World Organization of Animal Health. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. Disponível em: <<http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/>>. Acesso em 10 de novembro de 2015.
 34. Oliveira, T. V. S., et al., 2012. Variáveis climáticas, condições de vida e saúde da população: a leptospirose no Município do Rio de Janeiro de 1996 a 2009. **Ciência & Saúde Coletiva**, 17 (6),1569-1576.
 35. Peralta, M.B.L, Warth, J.F.G., 2016. Avaliação dos títulos sorológicos pós-vacinais para leptospirose canina através da técnica de microaglutinação microscópica.
 36. SANTOS, A.S. Infecção experimental em suínos por *Leptospira interrogans* sorogrupos icterohaemorrhagiae e pomona. Tese. 2014.
 37. Sehgal, S. C., et al., 2003, Field application of Lepto lateral flow rapid diagnosis of leptospirosis. **Journal of Medical Microbiology**, 52, 897-901.
 38. Senthilkumar, T. M. A., et al., 2010. Serodiagnosis of bovine leptospirosis by igg-enzyme-linked immunosorbent assay and latex agglutination test. **Tropical Animal Health and Production**. 42,217-222.

39. Singla, L. D., et al., 2011. Sero detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs from Ludhiana district of Punjab, India. **Journal of Parasitic Disease**. 35 (2), 195-198.
40. Smits, H. L., et al., 2001. Lateral-flow assay for rapid sero diagnosis of human leptospirosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. 8 (1),166-169.
41. Souza, M. A., et al., 2012. Padronização e validação de Elisa indireto para o diagnóstico da leptospirose bovina. **Bioscience Journal**, 28 (6), 993-999.
42. Tesserolli, G. L., et al., 2005. Soroprevalência para leptospirose em cães de Curitiba, Paraná. **Revista Acadêmica**. 3(4), 35-38.
43. Tomich, R.G.P., 2007. Leptospira is sero survey in bovines from Brazilian pantanal using IgG ELISA with recombinant protein LipL32 and microscopic agglutination test. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38(4), 674-680.
44. Trevejo R.T., Rigau-Pérez, J.G., et al, 1998. Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua, 1995. **The Journal of Infectious Diseases**, 178 (5), 1457-1463.
45. Tuemmers, C., et al. 2013. Prevalencia de leptospirosis em perros vagos capturados em la ciudad de Temuco, 2011. **Revista Chilena del Infectologia**. 30 (3), 252-257.
46. van Bekkun, J. G. The influence of foot-and-mouth disease vaccination of the mother on the level of neutralizing antibody in her young. **Bull. Off. Int. Epizoot.**, Paris, n. 65, p. 439-442, 1966.
47. Wang, W., et al. 2014. *Leptospira interrogans* induces uterine inflammatory responses and abnormal expression of extracellular matrix proteins in dogs. *Microbial Pathogenesis*, 75,1-6.
48. Woodward, M. J., et al., 1997. *Leptospira hardjo* sero diagnosis: a comparison of MAT, ELISA and ImmunoComb. **The Veterinary Record**, 6,603-604.