

UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO

Curso de Medicina Veterinária

Natane Hellen Guerra Pedro

**IDENTIFICAÇÃO DO SOROVAR MAIS PROVÁVEL E ISOLAMENTO
DE *Leptospira* spp. EM CÃES COM SUSPEITA CLÍNICA DE
LEPTOSPIROSE**

São Paulo

2016

Natane Hellen Guerra Pedro

**IDENTIFICAÇÃO DO SOROVAR MAIS PROVÁVEL E ISOLAMENTO
DE *Leptospira* spp. EM CÃES COM SUSPEITA CLÍNICA DE
LEPTOSPIROSE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade de Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Amane Paldês Gonçalves

São Paulo

2016

Pedro, Natane Hellen Guerra

Identificação do sorovar mais provável e isolamento de *Leptospira* spp. em cães com suspeita clínica de leptospirose / Natane Hellen Guerra Pedro. – São Paulo , 2016
50 f.

TCC Graduação (Medicina Veterinária) - Universidade de Santo Amaro, 2016

Orientador(a): Amane Paldês Gonçalves

1.leptospirose canina. 2.diagnóstico. 3.zoonose. I.Gonçales, Amane Paldês, orient. II.Universidade de Santo Amaro III.Titulo

Natane Hellen Guerra Pedro

**IDENTIFICAÇÃO DO SOROVAR MAIS PROVÁVEL E ISOLAMENTO
DE *Leptospira* spp. EM CÃES COM SUSPEITA CLÍNICA DE
LEPTOSPIROSE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade de Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Amane Paldês Gonçalves

São Paulo, ____ de _____ de 20__

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Prof. Dr. _____

Conceito Final

AGRADECIMENTOS

À deus, pela oportunidade de estar vivenciando esse sonho.

À minha mãe, Elaine Guerra, pelas palavras de amor, carinho, cuidado e por não me deixar desistir dos meus objetivos, nem mesmo nos momentos mais difíceis.

Aos meus avós, pelo amor, incentivo e apoio incondicional. E a todos os meus familiares.

Ao Leonardo, que apesar de todas as dificuldades, aborrecimentos e neurose que me atingia, se manteve sempre ao meu lado, me dando forças, amor e incentivo e por me ajudar na concretização desse sonho. Serei eternamente grata.

À minha orientadora, pela oportunidade e apoio na elaboração deste trabalho.

À esta universidade, ao seu excelente corpo docente e direção que abriram as portas para minha formação profissional.

Agradeço a todos os meus professores pela dedicação e empenho em compartilhar comigo seus conhecimentos, por me ensinarem e ter me feito aprender.

Agradeço a todos os meus amigos, que fizeram parte da minha formação, pelos momentos que passamos juntos, pelas risadas e pela amizade. Irão continuar presentes na minha vida eternamente.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa de iniciação científica e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

À todos que direta ou indiretamente fizeram parte dessa fase a minha vida, o meu muito obrigada.

“[...] Segure firme, seja forte e seja verdadeiro consigo mesmo.
Tudo irá conspirar ao seu favor. Você não está atrasado, nem adiantado, você
está exatamente na hora certa!”

Sri Sri Ravi Shankar

RESUMO

Tendo em vista a importância da leptospirose canina na saúde pública, devido à possível participação dos cães na cadeia epidemiológica da leptospirose humana, o objetivo deste trabalho foi utilizar o cão com suspeita clínica de leptospirose como sentinela de contaminação ambiental para a ocorrência de leptospirosas patogênicas na zona sul do município de São Paulo. Foram analisadas 18 amostras sanguíneas de cães com suspeita clínica de leptospirose, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Santo Amaro. O diagnóstico foi realizado pela técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM) com 24 antígenos. Dos 18 soros examinados, 11 foram sororreagentes (61,1%) para a leptospirose com títulos variando de 100 a 3200. Os sorovares encontrados foram Copenhageni com 36,6% (4/11), Cynopteri com 27,7% (3/11), Icterohaemorrhagiae com 18,1% (2/11), e Bratislava e Butembo ambos com 9,09% (1/11). As manifestações clínicas mais comuns foram icterícia, anorexia, dor abdominal, apatia, êmese e anúria. No hemograma, anemia e leucocitose por neutrofilia foram achados frequentes. Em relação aos achados da bioquímica sanguínea, os mais comuns foram azotemia, hiperglobulinemia e hipoalbuminemia. As enzimas fosfatase alcalina, alanina transaminase apresentaram-se aumentadas, assim como os níveis séricos de ureia e creatinina, indicando lesões hepáticas e renais. A avaliação da condição de portador renal de *Leptospira* spp. realizada nas amostras de urina por meio da pesquisa do DNA de leptospirosas pela técnica de PCR e isolamento em meio de cultivo Fletcher foram negativas para a presença do agente etiológico.

Palavras-chave: Leptospirose canina, diagnóstico, zoonose

ABSTRACT

Considering the importance of canine leptospirosis in public health due to the possible participation of dogs in the epidemiological chain of human leptospirosis, the objective of this work was to use the dog with clinical suspicion of leptospirosis as a sentinel of environmental contamination for the occurrence of leptospires Pathogen in the southern area of the city of São Paulo. We analyzed 18 blood samples from dogs with clinical suspicion of leptospirosis, attended at the Veterinary Hospital of the University of Santo Amaro. The diagnosis was performed by the Microscopic Seroagglutination (SAM) technique with 24 antigens. Of the 18 sera examined, 11 were seroreagents (61.1%) for leptospirosis with titers ranging from 100 to 3200. The serovars found were Copenhageni with 36.6% (4/11), Cynopteri with 27.7% (3 / 11), Icterohaemorrhagiae with 18.1% (2/11), and Bratislava and Butembo both with 9.09% (1/11). The most common clinical manifestations were jaundice, anorexia, abdominal pain, apathy, emesis and anuria. Blood count, neutrophil anemia and leukocytosis were frequent findings. In relation to the findings of blood biochemistry, the most common were azotemia, hyperglobulinemia and hypoalbuminemia. Alkaline phosphatase, alanine transaminase enzymes were increased, as were serum levels of urea and creatinine, indicating hepatic and renal damage. The evaluation of the renal carrier status of *Leptospira* spp. Carried out in the urine samples by means of leptospires DNA research by the PCR technique and isolation in Fletcher culture medium were negative for the presence of the etiological agent.

Key words: Canine leptospirosis, diagnosis, zoonosis

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 Definição	10
1.2 Etiologia	14
1.3 Taxonomia	15
1.4 Patogenia	17
1.5 Diagnóstico	20
1.5.1 Métodos diretos	20
1.5.2 Métodos Indiretos	21
1.5.3 Diagnóstico diferencial	23
1.6 Tratamento	24
1.7 Profilaxia	25
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo Principal	27
2.2 Objetivos Secundários	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4 RESULTADOS	32
4.1 Sorologia e Identificação do sorovar	32
4.2 Manifestações Clínicas e Exames Laboratoriais	33
4.3 Reação em Cadeia de Polimerase	34
4.4 Isolamento	34
5 DISCUSSÃO	38
6 CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

1.1 Definição

A leptospirose é uma zoonose de caráter infeccioso que acomete o homem, animais silvestres e domésticos, transmitida por bactérias da espécie *Leptospira* spp. sendo assim, considerada de grande importância em saúde pública^{1,2}. As variadas espécies animais podem atuar como portadores (convalescentes e sadios) da doença, eliminando leptospirosas através da urina e disseminando-a no meio ambiente³. Os cães, devido ao contato próximo com o homem, são considerados um importante reservatório para esta espécie⁴.

A leptospirose possui distribuição universal^{1,2}, porém sua ocorrência varia nas diferentes partes do mundo, podendo ocorrer de forma endêmica ou esporádica^{5,6}. Por se tratar de uma doença infecciosa em constante crescimento, grandes surtos em humanos foram relatados em diversos países como Estados Unidos, Sudeste asiático, Índia, Malásia e Nicarágua³.

No Brasil, a leptospirose é considerada uma doença endêmica e em períodos chuvosos, torna-se uma doença epidêmica, principalmente em locais quentes, com inundações⁵, desprovidos de saneamento básico e com grande infestação de roedores^{7,8,9,10}. No período de 2006 a 2016, foram notificados em humanos 38.458 casos de leptospirose, variando de 4.386 em 2006 a 2.092 em 2016 e o número de óbitos registrado em 2016 foi de 3.688¹¹.

O homem quando em contato direto ou indireto com urina de animais infectados, torna-se hospedeiro acidental do agente etiológico causador da leptospirose. Os roedores das espécies *Mus musculus* (camundongo), *Rattus rattus* (rato preto) e o *Rattus norvegicus* (rato de esgoto) são os principais reservatórios desse agente etiológico, sendo considerado o transmissor mais importante no meio urbano¹².

Em humanos a leptospirose acomete profissionais que possuem maior risco de entrar em contato com o agente, como veterinários, catadores de lixo, trabalhadores em limpeza de desentupimento de esgotos, tratadores de animais,

trabalhadores rurais, agricultores, etc^{8,6}. É conhecida também por Doença de Weil, febre dos arrozais, febre dos pântanos, febre outonal, entre outras. Em cães, como tifo canino e Doença de Stuttgart⁷.

Em diversas regiões do país, foram realizados inquéritos sorológicos em cães para conhecer a sororreatividade para *Leptospira* spp. Em Uberlândia (MG), Castro et al.¹³, examinaram 268 cães, encontrando reatividade em 76 cães. Jouglard e Brod.¹⁴ analisaram soros sanguíneos de 489 cães e encontraram 2,7% de positividade, na cidade de Pelotas (RS). Tesseroli et al.¹⁵, em Curitiba (PR) obtiveram 32,27% de reagentes em 598 amostras. No estado de São Paulo, em Botucatu, Modolo et al.¹⁶ examinaram 775 soros, dos quais 199 foram reagentes. Em Parelheiros (SP) e Santana de Parnaíba (SP), Sarmiento et al.¹⁷ e Mascolli et al.¹⁸, encontraram soroprevalência para *Leptospira* spp. de 6,6% e 15% de positividade, dos 90 e 410 cães examinados, respectivamente. Estes e outros inquéritos sorológicos estarão descritos no Quadro 1.

Devido capacidade de infectar diversas espécies, a leptospirose assume grande importância como um problema de interesse econômico e de saúde pública¹⁹ e animal, pois acomete animais de produção como suínos, bovinos, ovinos, caprinos e equinos causando problemas como queda na produção de carne e leite, reprodutivos como abortos, fetos prematuros, retenção de placenta, infertilidade e mastite^{20,21}.

Por tratar-se de uma zoonose, o controle da leptospirose canina possui grande importância em saúde pública, já que o cão é considerado a principal fonte de infecção para os seres humanos em áreas urbanas, após os roedores, pois podem eliminar leptospiras vivas na urina mesmo sem apresentar manifestações clínicas e por possuir íntimo contato com o homem^{14,22}.

O hospedeiro preferencial do sorovar Canicola é o cão, os bovinos são considerados hospedeiros preferenciais do sorovar Hardjo e do sorovar Pomona, que também tem como hospedeiro preferencial os gambas e os suínos²¹. O rato de esgoto é hospedeiro natural dos sorovares Copenhageni e Icterohaemorrhagiae²³. Outros sorovares com seus hospedeiros preferenciais estarão descritos na Tabela 1.

Quadro 1 – Distribuição de alguns inquéritos sorológicos em diversas regiões do Brasil em cães hígidos e com suspeita clínica de Leptospirose e a soroprevalência encontrada nos cães

Local	Número de amostras	Soropositivos (%)	Sorovares mais frequentes
Pelotas – RS Jouglard et al., 2000 ¹⁴	489	2,66%	Icterohaemorrhagiae, Copenhageni - 30,7% Australis - 23,08% Canicola - 23,08%
Diversos estados Favero et al., 2002 ²⁴	983	22,84%	Copenhageni - 24% Icterohaemorrhagiae - 10,9%
Santana de Parnaíba – SP Mascolli et al., 2002 ¹⁸	410	15%	Copenhageni - 24% Canicola e Hardjo - 20% Pyrogenes, Autumnalis -12% Grippothyphosa - 8% Castenolis - 4%
Porto Alegre – RS *Wolffenbuttel et al., 2004 ²⁵	7	100%	Copenhageni - 85,7% Canicola – 14,2%
Botucatu – SP Lopes et al., 2005 ²⁶	1000	17,9%	Catellonis - 28,68% Autumnalis - 19,12% Pyrogenes - 17,65% Icterohaemorrhagiae - 11,03% Canicola - 9,56% Australis - 4,41% Shermani - 3,68%
Itapema – SC Blazius et al., 2005 ²²	590	10,5%	Pyrogenes 18% Canicola 13,8% Icterohaemorrhagiae e Copenhageni 12,5%

Campina Grande – PB Batista et al., 2005 ²⁷	285	21,4%	Autumnalis - 7,4% Copenhageni - 6% Canicola - 2,1%
Botucatu – SP Modolo et al., 2006 ¹⁶	775	15,3%	Canicola - 40,3% Pyrogenes - 34,5% Copenhageni - 5% Autumnalis - 6,7% Bratislava e Icterohaemorrhagiae - 4,2%
Rio de Janeiro – RJ *Freire et al., 2014 ²⁸	120	73,3%	Icterohaemorrhagiae - 50% Copenhageni - 15,8% Canicola - 7,5%
Rio de Janeiro – RJ *Freire et al., 2008 ²⁹	120	73,3%	Icterohaemorrhagiae - 73,3%
Curitiba – PR Tesseroli et al., 2008 ¹⁵	598	32,27%	Copenhageni - 71,5% Canicola - 6,74% Icterohaemorrhagiae - 2,08%
Aracajú – SE Lemos et al., 2010 ³⁰	100	37%	Autumnalis 32,45 Andamana - 21,6% Hardjo - 13,5% Icterohaemorrhagiae - 10,8% Pyrogenes, Grippytyphosa, Shermani – 5,4%
Uberlândia – MG Castro et al., 2011 ¹³	268	28,4%	Autumnalis 34,2% Tarassovi 23,7% Canicola 17,1% Grippytyphosa 14,5%
Uberlândia – MG Ferreira et al., 2012 ³¹	236	52,96%	Copenhageni - 36,2 %

Curitiba – PR Negrão et. al., 2012 ³²	40	5%	Copenhageni - 2,5% Icterohaemorrhagiae - 2,5%
Uberlândia - MG *Castro et al., 2014 ³³	140	15%	Autumnalis - 43,3% Grippotyphosa - 23% Canicola - 15% Bratislava - 7,6% Icterohaemorrhagiae, Tarassovi e Wolffi - 3,7% cada
Patos – PB Alves et al., 2014 ³⁴	190	8,95%	Autumnalis - 42,31% Bratislava - 15,38% Australis - 11,54% Butembo, Griphottyphosa e Icterohaemorrhagiae - 7,69% Andamana e Wolffi - 3,85%

*Cães apresentando sinais clínicos para leptospirose

1.2 Etiologia

Inada e colaboradores observaram pela primeira vez, na universidade de Kyushu no Japão, em novembro de 1914, a espiroqueta no tecido hepático de uma cobaia, inoculado com sangue de um paciente acometido pela doença de Weil. Concluíram então, que esta espiroqueta era o agente etiológico daquela doença e o denominaram de *Spirochaeta icterohaemorrhagiae*³⁵. Em 1917, Miyajima e colaboradores, demonstraram que os ratos eram possíveis carreadores de leptospirosas, mostrando que 40% deles eram portadores renais³⁶, propondo-se a criação do gênero *Leptospira*, por possuir características espiraladas.

O primeiro relato de leptospirose canina no Brasil ocorreu na cidade do Rio de Janeiro em 1940, onde 11 cães apresentaram manifestações clínicas compatíveis com leptospirose, sendo o diagnóstico confirmado pela presença do agente etiológico através da necropsia².

Tabela 1 – Relação de alguns sorovares de leptospiros patogênicos e seus respectivos hospedeiros preferenciais

Sorovares	Reservatórios
Icterohaemorrhagiae	Ratos: <i>Rattus norvegicus</i> , <i>Rattus rattus</i>
Copenhageni	Rato: <i>Rattus norvegicus</i>
Pomona	Suínos, bovinos, gambás
Grippotyphosa	Animais silvestres: Racom, gambá, rato almiscarado, lebre, hamster, ratos silvestres
Hardjo	Bovinos
Bratislava	Suínos, bovinos
Canicola	Cão
Pyrogenes	<i>Rattus norvegicus</i>

Fonte: (Hagiwara, 2004)³⁷

1.3 Taxonomia

As leptospiros são bactérias da classe *Spirochaetes*, ordem *Spirochaetales* que possuem duas famílias: *Spirochaetaceae* e *Leptospiraceae*. O gênero *Leptospira*, pertence à família *Leptospiraceae* foi primeiramente dividido, de acordo com as características fenotípicas, em duas espécies *Leptospira biflexa* e *Leptospira interrogans*. Nesta classificação com base nas características dos antígenos do envelope externo de natureza lipopolissacarídea (LPS) foram estabelecidos os sorogrupos e sorovares de leptospiros patogênicos e saprófitas. A *L. biflexa* reúne os sorovares saprófitas ou de vida livre, sendo aproximadamente 38 sorovares agrupados em seis sorogrupos, sendo encontradas principalmente em água doce e no meio ambiente. Esta espécie se diferencia da *L. interrogans* por crescer a 13°C e na presença de 8-azaguanina (Tabela 2). A *L. interrogans*, espécie patogênica, possui cerca de 200 sorovares agrupados em 23 sorogrupos^{36,3}.

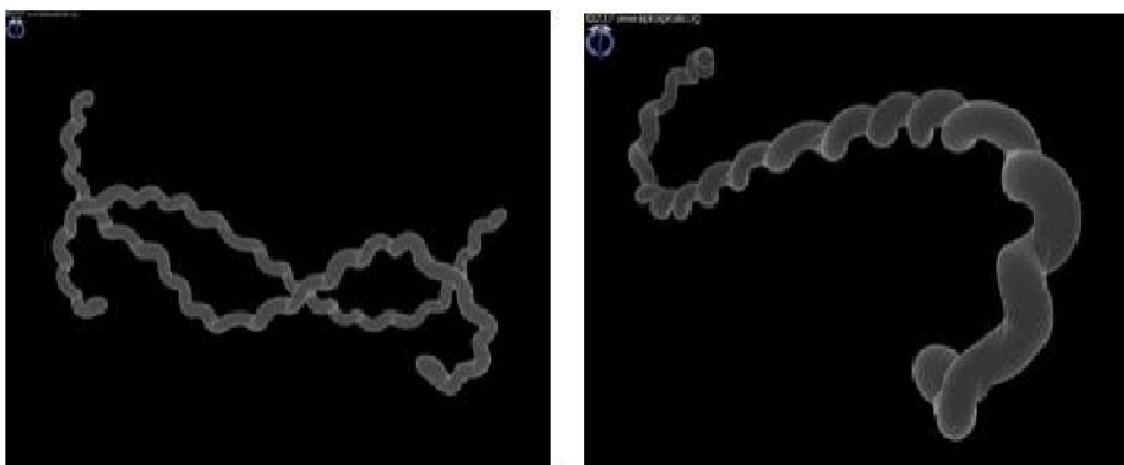
Tabela 2 – Diferenciação entre as estirpes saprófitas e patogênicas de leptospirosas

Espécies	Crescimento		Saprófita	Patogênica
	13°C	Presença de 8-azaguanina (225 µg/m)		
<i>L. biflexa</i>	Sim	Sim	Sim	Não
<i>L. interrogans</i>	Não	Não	Não	Sim

Fonte: (Genovez In Megid, et al 2016) ²¹

Estas espiroquetas (Figura 1) são micro-organismos aeróbios obrigatórios, Gram-negativos, móveis, longos e finos com aproximadamente 1-20 µm de comprimento por 0,1 µm de diâmetro, capazes de atravessar filtros que retêm outras bactérias. Apresentam extremidades em forma de gancho e um par de flagelos. Lipopolissacarídeos (LPS) e mucopeptídeos antigênicos fazem parte da composição de seu envelope externo^{36,2,38}. Corantes anilínicos não são capazes de corá-las com eficiência e quando não coradas podem ser visualizadas em microscopia de campo escuro ou microscopia de contraste de fase. Apresentam crescimento ótimo em meios de cultura artificiais enriquecidos com vitaminas, ácidos graxos de cadeia longa e sais de amônio e em temperatura ideal de 28°C a 30°C^{36,3}.

Figura 1 - Representação computadorizada em 3D da morfologia da bactéria do gênero *Leptospira* spp.



Fonte: The Leptospirosis Information Center <http://www.leptospirosis.org>³⁹

As leptospiras no ambiente são pouco resistentes, sendo destruídas pela dessecação, temperaturas altas, pH ácido, desinfetantes comuns e antissépticos. Sua multiplicação ocorre em condições adequadas de salinidade, temperatura e pH neutro ou levemente alcalino (7,2 a 7,4), na água ou lama, onde não houver radiação ultravioleta direta¹².

1.4 Patogenia

As portas de entrada das leptospiras são as mucosas (ocular, digestiva, respiratória e genital) e principalmente a pele, íntegra, com escoriações ou poros dilatados. As formas de transmissão podem ser direta, quando há contato direto entre o suscetível e a fonte de infecção, sangue e via venérea ou pela forma indireta, quando há contato com alimentos ou ambientes contaminados com urina de animais infectados⁶.

Na fase de leptospiremia (multiplicação das leptospiras na corrente sanguínea), as leptospiras patogênicas, invadem o sistema linfático e sanguíneo, disseminando-se no organismo do hospedeiro rapidamente, alcançando vários órgãos e tecidos (baço, fígado, sistema nervoso central, rins, olhos), enquanto que as leptospiras não patogênicas são fagocitadas⁴⁰.

Após o período de incubação de cinco a sete dias, surgem as primeiras manifestações clínicas. Estas dependem principalmente da virulência de cada sorovar, da dose infectante e da capacidade do organismo em produzir anticorpos e combater a infecção. Com a resposta imune humoral do hospedeiro, as leptospiras reduzem sua concentração sérica e deslocam-se para lugares onde a resposta humoral é quase nula ou totalmente nula, como a câmara anterior, aparelho reprodutor e os túbulos renais^{6,41}.

A lesão primária causada pela leptospirose ocorre no endotélio vascular após dois dias da penetração, nos pequenos vasos causa vasculite, isquemia localizada e edema intersticial. Alterações que podem causar necrose tubular renal, lesão

hepática, pulmonar, meningite, miosite e placentite. Na primeira semana de infecção é possível encontrar leptospiras nos túbulos renais, e na segunda semana no lúmen tubular. É comum a ativação da cascata de coagulação, levando a uma coagulação intravascular disseminada, consequência da resposta inflamatória de citocinas^{36,3,42}.

A leptospiúria, eliminação das leptospiras na urina, ocorre devido aos anticorpos atuarem contra os antígenos de leptospiras na circulação sanguínea, estas não persistem em diversos órgãos, porém nos rins, elas permanecem ativas devido aos túbulos proximais renais serem um local imunologicamente protegido, tornando o hospedeiro um portador renal, eliminando leptospiras na urina durante dias ou meses de forma intermitente. A colonização renal ocorre após o agente invadir os capilares renais, ir para o interstício e após duas semanas de permanência nas células tubulares proximais, começam a serem excretadas pela urina⁴⁰. Porém, em estudos realizados por Bal et al.⁴³ revelaram ser possível o diagnóstico pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) através da urina em pacientes humanos nos primeiros dias pós infecção, antes mesmo dos anticorpos serem detectados no sangue. Identificaram também a eliminação de leptospiras na urina de pacientes mais de um ano após a doença, mesmo sendo tratados com os antibióticos (penicilina, amoxicilina e vibramicina).

No cão, a leptospirose geralmente se manifesta de duas formas a forma anictérica e a forma ictérica.

Na forma nefrítica ou anictérica, normalmente causada pelo sorovar Canicola, ocorre acometimento renal. O cão manifesta quadros clínicos associados a insuficiência renal, como gastroenterite, uremia, ulcerações, necrose de língua e desidratação. Nas formas mais graves pode ocorrer comprometimento hepático e nos casos mais discretos da leptospirose, pode ocorrer nefrite intersticial crônica, com leptospiúria^{18,23}.

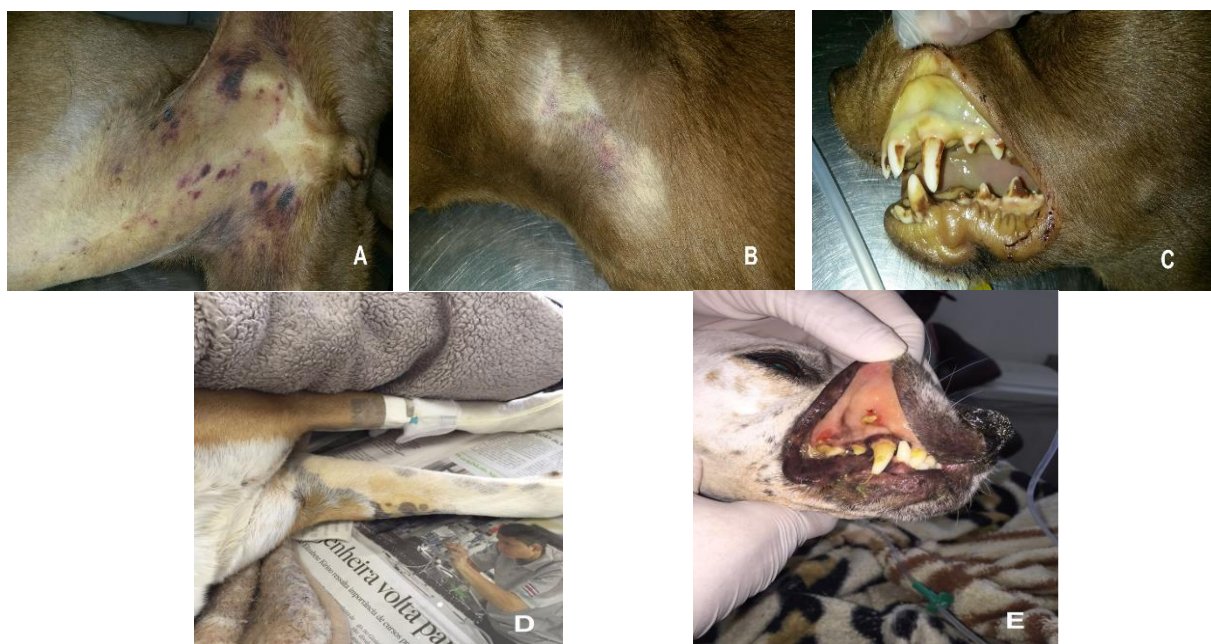
A forma hepatonefrítica ou ictérica é causada pelo sorovar Icterohaemorrhagiae que acomete o fígado e os rins de maneira severa, podendo causar hemorragias agudas, icterícia, uremia, prostração, febre, mialgia, oligúria, anúria e levar o animal a óbito em poucas horas^{23,36}.

Os sorovares Grippothyposa, Autummalis e Bratislava, também podem acometer os cães e manifestar sintomas parecidos com infecções pelos sorovares Canicola e Icterohaemorrhagiae, porém a forma mais comum é a anictérica³. Enquanto que o sorovar Pomona causa comprometimento hepático⁴⁰.

Nas lesões hepáticas, o grau de icterícia na leptospirose canina está relacionado a gravidade da necrose hepática. A persistência da leptospira no fígado pode causar fibrose, distúrbios imunológicos e alteração da circulação hepática. Meningite, nefrite intersticial e uveíte são consequências da deposição de imunocomplexos⁴⁰.

As manifestações clínicas geralmente encontradas são hipertermia, icterícia, hemorragias, petéquias, gastroenterite hemorrágica, mialgia, êmese, hematêmese, desidratação, anorexia, poliúria na fase subaguda e oligúria ou anúria na fase aguda²⁵, alguns sinais clínicos podem ser observados na Figura 2. Alterações laboratoriais mais comuns são anemia, leucocitose, trombocitopenia e aumentos dos níveis séricos de creatinina, ureia, fosfatase alcalina (FA), alanina-aminotransferase (ALT), bilirrubina direta e indireta^{40,45,29,45}.

Figura 2 – Exame clínico de cão com leptospirose. É possível notar petéquias, purpuras e hematomas (A e B); Intensa icterícia em mucosa oral (C), membro (D); Presença de úlceras orais (E)



Fonte: Arquivo pessoal

1.5 Diagnóstico

O diagnóstico da leptospirose consiste em avaliar as manifestações clínicas que incluem icterícia, anorexia, desidratação e apatia, o histórico epidemiológico e análise dos exames laboratoriais. Os exames complementares como hematologia e bioquímica sérica podem ser sugestivos de leptospirose, devido a alterações como anemia, trombocitopenia, leucocitose, azotemia e alterações hepáticas, alterações normalmente encontradas nos casos da doença^{7,3}.

A confirmação do diagnóstico da leptospirose pode ser realizada através de métodos diretos, como a visualização do agente etiológico no sangue, urina e outros tecidos ou do seu material genético e métodos indiretos, através de pesquisas de anticorpos antileptospiras⁴¹. As leptospiras podem ser visualizadas diretamente através de microscopia em campo escuro, imunofluorescência ou por microscopia ótica, após serem devidamente corada pela técnica de coloração de impregnação pela prata³.

1.5.1 Métodos diretos

1.5.1.1 Isolamento do agente

Pode ser realizado através de amostras de animais suspeitos ou pós-morte. A partir de cinco a sete dias pós-infecção é difícil realizar a cultura de sangue e tecidos, a não ser que o material da amostra seja de sítios imunológicos privilegiados, cérebro, câmara anterior do olho e túbulos renais, onde o sistema imune do organismo não atua⁴⁶. A realização do isolamento consiste em inocular uma amostra suspeita em animais de laboratório por via intraperitoneal ou em meios de cultivo apropriados para o crescimento de *Leptospira* spp. como os meios de Fletcher, Stuart e Ellinghausen-McCullough modificados por Johnson e Harris (EMJH)^{36,19}. Os meios de cultivo podem ser líquidos, sólidos ou semissólidos. Os animais de laboratório susceptíveis à leptospirose sofrem eutanásia, após o aparecimento das manifestações clínicas, seus órgãos (fígado, rim e pulmão) são

processados e inoculados nos meios de cultura apropriados para o isolamento da bactéria. Entretanto, as técnicas de isolamento são demoradas e trabalhosas e, ainda, as amostras podem estar contaminadas por outros micro-organismos, dificultando assim o crescimento das espiroquetas².

Figura 3 – Isolamento de *Leptospira* spp. em meio semissólido Fletcher, mostrando a zona de dingier



Fonte: <http://slideplayer.com.br/slide/2335991/>⁴⁷

1.5.1.2 Detecção do DNA – Reação em cadeia de polimerase (PCR)

A técnica de PCR detecta o DNA de *Leptospira* spp. de amostras de tecidos e fluidos corporais. Esta técnica é específica e sensível, porém não identifica o sorovar infectante².

1.5.2 Métodos Indiretos

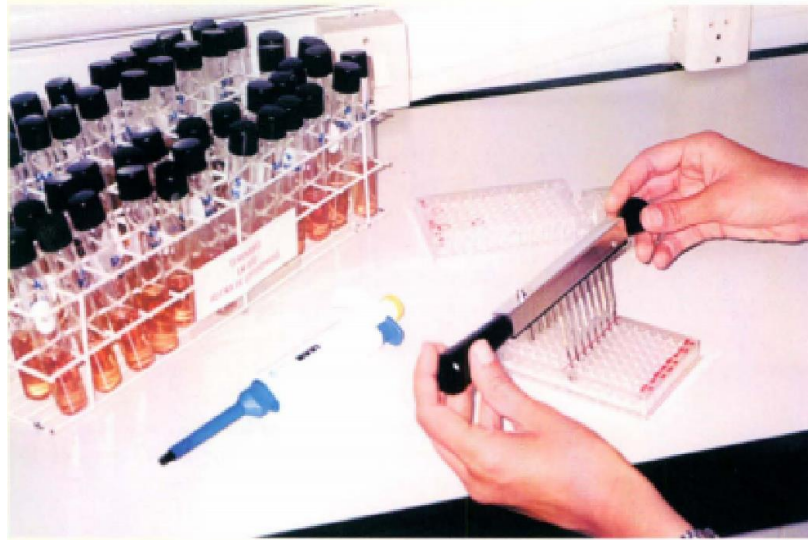
1.5.2.1 ELISA-IgM

O ELISA-IgM detecta anticorpos da classe IgM em amostras sorológicas de animais suspeitos. É um teste específico, sensível e de fácil execução, porém quando em infecções recentes, na primeira semana ou em amostras de locais endêmicos, pode resultar em resultado falso-negativo. Animais vacinados para alguns sorovares podem ser reativos no teste, dificultando a interpretação do mesmo⁴².

1.5.2.2 Soroaglutinação Microscópica (SAM)

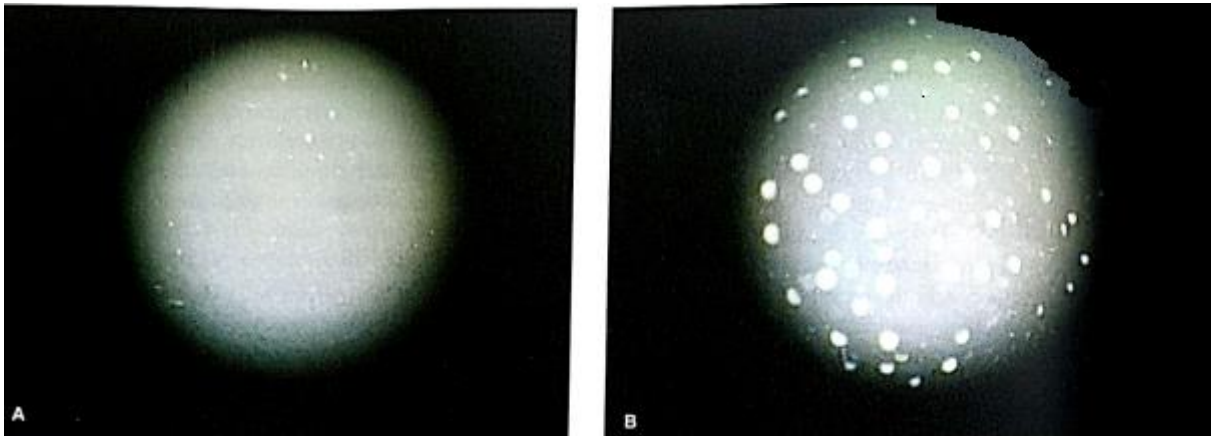
A SAM é o teste de diagnóstico de referência preconizado pela Organização Mundial de Saúde¹⁹. Esta técnica consiste na reação de aglutinação entre o antígeno presente na membrana dos diversos sorovares de *Leptospira* spp. e os anticorpos no soro da amostra suspeita². Os antígenos utilizados devem conter pelo menos um sorovar de cada sorogrupo existente. Podem existir reações cruzadas contra diferentes sorovares, dificultando a identificação do sorovar infectante²³. Amostras pareadas são de extrema importância, pois revelam se a infecção persiste e em qual fase se encontra. Quando a diferença da primeira para a segunda amostra é maior ou igual a quatro diluições, indica infecção aguda. Quando não for possível a realização da sorologia pareada, é levado em consideração a sintomatologia apresentada e o título maior que 800, sugestivo de leptospirose²³. Nos casos de coaglutinações sorológicas, ou seja, reatividade para mais de um sorovar, será considerado como o provável sorovar infectante aquele que apresentar a maior titulação³⁶.

Figura 4 – Teste de Soroaglutinação Microscópica para diagnóstico de Leptospirose



Fonte: (Langoni et al., 1999)¹²

Figura 5 – Reação do teste Soroaglutinação microscópica (SAM) em microscópio óptico de campo escuro, diluição 1:100. Não reagente (A); Reagente (B)



Fonte: Genovez In Megid, 2016²¹

1.5.3 Diagnóstico diferencial

Os principais diagnósticos diferenciais em humanos incluem pneumonias, colecistite aguda, doença de chagas, riquetsioses, malária, febre amarela, dengue hemorrágica, hepatites virais agudas, influenza, febre tifoide, vasculites, meningites, sepse entre outras⁹.

Em cães, a leptospirose pode ser confundida com babesiose, neoplasias hepáticas, anemia hemolítica imunomediada, ehrlichiose e intoxicação por dicumarínico⁴⁸.

1.6 Tratamento

O tratamento inicial da leptospirose consiste em terapia de suporte de acordo com as manifestações clínicas apresentadas e antibioticoterapia de forma a reduzir a multiplicação sérica de leptospiras e complicações como a insuficiência hepática, renal e assim, a leptospiúria²³. O uso de fluidoterapia para animais desidratados, anoréticos, com êmese, diarreia e para avaliação do débito urinário quando apresentarem oligúria ou anúria são medidas necessárias, podendo iniciar a administração de diuréticos após insucesso com fluidoterapia, monitorando sempre a função renal^{40,48}.

Quanto mais cedo iniciar a terapia com antibióticos, melhor será a eliminação da leptospiremia. Penicilinas, cefalosporinas, aminoglicosídeos, tetraciclina e macrolídeos são antibióticos de eleição para o tratamento, sendo a classe das penicilinas a de primeira escolha, entre eles pode-se citar a Ampicilina na dose 20-40 mg/kg/a cada 6-8 horas; Penicilina G 25.000-40.000 UI/kg/a cada 12 horas; Amoxicilina 10-20 mg/kg/a cada 12 horas, porém esses fármacos não são capazes de eliminar a excreção renal. Já o uso da doxiciclina (tetraciclina) 5 mg/kg/a cada 12 horas, por no mínimo três semanas, é indicado para eliminar as espiroquetas do rim, eliminando a leptospiúria⁴⁰.

Vários estudos relatam a eficácia de certas drogas na eliminação da condição de portador renal. Tonin et al.⁴⁹ analisaram soros de 60 bovinos, na cidade de São Martinho-RS e relataram a eficácia no tratamento com estreptomicina 25mg/kg em dose única dos 50 animais soropositivos para leptospirose. Girio et al.⁵⁰ observou eficácia na eliminação dos portadores renais após o terceiro dia de tratamento com estreptomicina em 14 touros positivos para leptospirose na cidade de São Paulo-SP. Em um estudo realizado por Santos et al.⁵¹ com 214 hamsters experimentalmente infectados com leptospiras e tratados com ceftiofur sódico nas concentrações de 25,

30 e 40mg/kg, demonstraram que este medicamento foi capaz de eliminar a colonização renal em 48 animais.

O mecanismo de ação das penicilinas é causar lise celular ao se ligar e inibir as enzimas (transpeptidases de membrana) que sintetizam o peptidoglicano, presente na parede celular bacteriana, sendo metabolizadas no fígado e excretadas na urina⁵².

A doxiciclina, é um tetraciclina semi-sintética, de ação longa e age inibindo a síntese proteica, impedindo o acesso da bactéria ao núcleo da célula hospedeira. Deve-se ter cautela no seu uso, pois é hepatotóxica⁵².

A estreptomicina é um antibiótico bactericida, liga-se aos ribossomos bacterianos e produz proteínas defeituosas, sendo eliminada pelos rins na forma ativa, por isso é contraindicado em pacientes com alterações renais⁵².

O prognóstico está diretamente relacionado a carga bacteriana infectante, ao estado imune do hospedeiro, sorovar envolvido, tempo desde o início dos sintomas ao início do tratamento, resposta imune do hospedeiro e idade do mesmo⁴⁸.

1.7 Profilaxia

A prevenção dessa doença, tanto em animais quanto em humanos, está diretamente relacionada ao controle de seus reservatórios, sejam eles roedores ou animais infectados, imunização preventiva dos susceptíveis, desinfecção do ambiente, medidas de higiene com alimentos e lugares propensos a enchentes. O controle dos roedores pode ser feito através de medidas ambientais, visando diminuir a reprodução destes animais próximos as instalações, eliminar a água e restos de alimentos e também através da desratização mecânica ou química⁸.

A vacinação é a maneira mais eficaz para a prevenção da doença, tanto nos cães como nos animais de produção. No entanto, as vacinas antileptospiras induzem memória imunológica de curta duração⁴¹, por isso recomenda-se o reforço a cada seis meses dos animais suscetíveis²³. O uso de vacinas não impede que os animais se infectem com outros sorovares que não estejam presentes na sua

formulação, pois a grande maioria dos sorovares não induz resposta cruzada. Vacinas para humanos não estão disponíveis no Brasil⁸.

As vacinas para leptospirose animal são bacterinas, ou seja, bactérias mortas⁵³ que induzem imunidade humoral e sorovar-específica. Em todo o mundo os sorovares presentes nas vacinas, por serem os mais frequentes em cães, são os sorovares Icterohaemorrhagiae e Canicola. Outros sorovares, como o Bratislava, Pomona e Grippotyphosa já foram isolados de cães que convivem com os reservatórios naturais destes sorovares ou que tiveram contato com locais contaminados. Portanto, é de extrema importância a utilização de vacinas que contenham os sorovares mais prevalentes da região²³.

No Brasil, encontra-se comercialmente as vacinas polivalentes que conferem imunidade para Cinomose, Parvovirose, Coronavirose, Parainfluenza, Hepatite, Adenovirose e Leptospirose, mudando apenas o número de sorovares de leptospirosas, sendo que a óctupla (V8) contém dois sorovares (Icterohaemorrhagiae e Canicola), déctupla (V10) apresenta quatro sorovares (Icterohaemorrhagiae, Canicola, Grippotyphosa e Pomona), undéctupla (V11) acrescenta o sorovar Copenhageni e a V12 com a inclusão dos sorovares Hardjo e Pyrogenes⁵⁴.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Principal

Tendo em vista a importância da leptospirose canina na saúde pública, o objetivo deste trabalho foi utilizar o cão com suspeita clínica de leptospirose atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Santo Amaro para verificar os sorovares que mais frequentemente infectam e causam a doença.

2.2 Objetivos Secundários

- Avaliar a condição de portador renal de leptospiras por meio das técnicas de PCR e isolamento em amostras de urina dos cães com suspeita clínica de leptospirose.
- Identificar os sorovares de *Leptospiras* spp. mais frequentes nos cães com suspeita clínica de leptospirose e dessa forma, contribuir com os estudos dos sorovares mais prevalentes no Brasil, para cada espécie de animal doméstico, com o objetivo de controlar a leptospirose animal por meio de vacinas que contenham na sua composição os sorovares mais prevalentes no país para a espécie em questão.
- Comparar os resultados do isolamento, do PCR com os obtidos na reação de Soroaglutinação Microscópica (SAM).
- Contribuir com a coleção de amostras isoladas de estirpes autóctones, importantíssimas para diversas pesquisas sobre o tema e principalmente para ensaios de vacinas antileptospiras.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisados 18 cães com sinais clínicos indicativos de leptospirose, com idade e raças variáveis e de ambos os sexos, provenientes do município de São Paulo, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Santo Amaro (UNISA), no período de agosto de 2015 a maio de 2016. Em todos os animais foram feitas coletas de amostras sanguíneas e de urina para a realização do teste diagnóstico para pesquisa de aglutininas antileptospiras no soro sanguíneo pela técnica de soroaglutinação microscópica em campo escuro (SAM) e para avaliar a leptospiúria nas amostras de urina foi realizada a pesquisa do DNA de leptospiras pela técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e pelo Isolamento em meio de cultivo de Fletcher.

As amostras foram coletadas com o consentimento dos proprietários de cada animal, sendo todos os procedimentos submetidos à autorização por escrito através do Termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE A) e antes de se efetuar qualquer procedimento terapêutico.

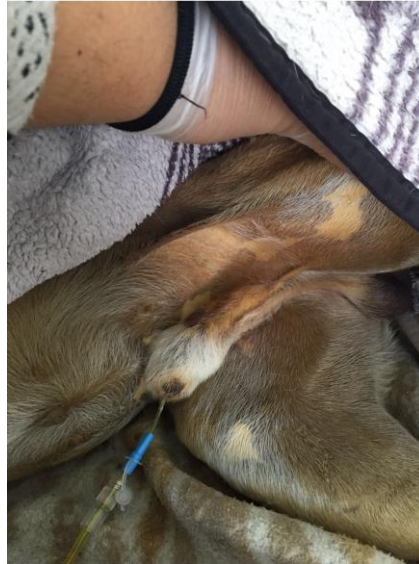
As amostras de sangue foram obtidas assepticamente por venopunção da jugular, com agulha 30x7 mm e seringa de 5 mL. Após a coleta, foram armazenadas em tubos do sistema vacutainer sem anticoagulante (tubos secos) para a sorologia, posteriormente mantidas temperatura ambiente e centrifugadas para a obtenção do soro, que foi alíquotado e armazenado a -20°C até o momento de sua análise.

As outras alíquotas de soro foram utilizadas para a realização de exames laboratoriais complementares, análises bioquímicas, para a determinação da atividade sérica de alanina-aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA) e dos níveis séricos de ureia, creatinina, proteína total, albumina, globulinas e bilirrubinas total, direta e indireta.

As amostras de urina foram coletadas dos machos através de sonda uretral (Figura 5) e das fêmeas através de cistocentese e armazenadas em tubos plásticos estéreis. Essas amostras foram divididas em duas alíquotas, sendo uma delas estocada imediatamente e mantida a -20°C para a extração de DNA bacteriano e a outra processada logo após a colheita para o isolamento das leptospiras. Em oito

casos não foi possível coletar urina, devido a apresentação de anúria por esses animais.

Figura 5 – Coleta de urina através de sonda uretral de um cão macho com suspeita clínica de leptospirose



Fonte: Arquivo pessoal

Para a mensuração dos níveis de aglutininas antileptospiras nos soros dos cães foi realizada a técnica de SAM no Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Departamento de Medicina Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP). Foram utilizadas culturas de antígenos vivos constituídos por 24 sorovares de leptospiras (Quadro 2). As culturas vivas de leptospiras foram mantidas em meio líquido de EMJH modificado⁵⁵, com quatro a 14 dias de crescimento e uma densidade aproximada 100 a 200 micro-organismos por campo microscópico, com aumento de 400 vezes. Os soros foram diluídos a 1:50 em solução salina tamponada de Sorensen e a reação foi efetuada em microplacas de poliestireno com 96 poços, com 50 µL de antígeno, a diluição final da mistura soro/antígeno 1:100, sendo este o ponto de corte da reação. Os soros positivos na triagem foram titulados em uma série de diluições geométricas de razão dois. A recíproca da maior diluição do soro que apresentou 50% de leptospiras aglutinadas foi considerada como o título do soro⁵⁶. As placas foram incubadas em estufa a 28-30°C por três horas. As leituras

foram realizadas em microscópio de campo escuro, no aumento de 100 vezes, observando-se a formação de aglutinação.

Para a caracterização do sorovar mais provável foi considerado o sorovar que apresentou maior título e o maior número de animais caracterizados como soro reagentes. O animal que reagiu para dois ou mais sorovares foi considerado soro reagente para o sorovar de maior título.

A avaliação da leptospirúria através da amostra de urina foi analisada por meio da pesquisa do DNA de leptospiras pela técnica de PCR e pelo Isolamento em meio de cultivo de Fletcher.

A técnica de Isolamento de leptospiras para o controle de infecção renal em meio de cultivo de Fletcher foi realizada no Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública da Universidade de Santo Amaro. Após a colheita as amostras de urina foram diluídas (1:10) individualmente em solução salina tamponada de Sorensen e filtradas com auxílio de um micro-filtro estéril para seringa com membrana de 0,22 µm a fim de promover a redução de bactérias contaminantes presentes na urina. Quinhentos microlitros por diluição foram semeados em tubos com tampa de baquelite contendo 4,5 mL de meio semissólido de Fletcher sem antibiótico⁵⁶, dois tubos por diluição, os quais foram incubados em estufa a 28-30°C por seis semanas, com observações semanais⁵⁷ para a verificação da formação do anel de crescimento subsuperficial (Zona de Dinger) de leptospiras no meio⁵⁶, o qual foi confirmado pela constatação efetiva de leptospiras em microscopia de campo escuro.

A amplificação do DNA bacteriano das amostras de urina foi realizado utilizando-se dois pares de *primers* descritos por Mérien et al.⁵⁸, Lep1 (5'GGCGGCGCGTCTTAAACATG-3') e Lep2 (5'-TTCCCCCATTGAGCAAGATT-3') que amplificam uma região de 330pb do gene 16S rDNA.

Quadro 2 – Relação dos sorovares de leptospiras utilizadas como antígenos na reação de Soroaglutinação Microscópica aplicada ao diagnóstico de leptospirose – São Paulo, 2016

Espécie	Sorogrupo	Sorovar	Estirpe
<i>L. interrogans</i>	Australis	Australis	Ballico
		Bratislava	Jez Bratislava
	Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A
		Butembo	Butembo
	Ballum	Castellonis	Castellon 3
	Bataviae	Bataviae	Van Tienen
	Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV
Celledoni	Whitcombi	Whitcombi	
<i>L. kirschneri</i>	Cynopteri	Cynopteri	3522C
	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskova V
<i>L. interrogans</i>	Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis
	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	M-20
		Icterohaemorrhagiae	RGA
	Javanica	Javanica	Veldrat Bat 46
	Panama	Panama	CZ 214K
	Pomona	Pomona	Pomona
	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
		Hardjo	Hardjoprajitno
	Sejroe	Wolffi	3705
	Shermani	Shermani	LT 821
	Tarassovi	Tarassovi	Perepelicin
Djasiman	Sentot	Sentot	
<i>L. biflexa</i>	Andamana	Andamana	CH 11
	Seramanga	Patoc	Patoc-1

4 RESULTADOS

4.1 Sorologia e Identificação do sorovar

Foram examinadas 18 amostras de soro sanguíneo dos cães clinicamente suspeitos para leptospirose. O diagnóstico foi realizado pela técnica de SAM com 24 antígenos vivos de *Leptospira* spp. Das 18 amostras analisadas, 61,1% (11/18) foram sororreagentes para leptospirose pela técnica de SAM. Destes 11 reagentes, os sorovares encontrados foram Copenhageni com 36,6% (4/11), Cynopteri com 27,7% (3/11), Icterohaemorrhagiae com 18,1% (2/11), Bratislava e Butembo com 9,09% (1/11) cada. As titulações de anticorpos encontradas variaram de 100 a 3200.

As principais características dos 11 animais reagentes, junto com as manifestações clínicas e o sorovar infectante estão descritas no Quadro 3 e os resultados do teste sorológico, contendo as titulações, estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3 - Distribuição de sorovares e títulos de anticorpos obtidos pelo Teste de Soroaglutinação Microscópica (SAM) em cães com suspeita clínica atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Santo Amaro - São Paulo, 2016

Sorovar	Titulo					Frequência (%)
	100	200	800	1600	3200	
Copenhageni	-	-	-	3	1	4 (36,6)
Cynopteri	-	1	2	-	-	3 (27,7)
Icterohaemorrhagiae	1	1	-	-	-	2 (18,1)
Bratislava	1	-	-	-	-	1 (9,09)
Butembo	-	-	1	-	-	1 (9,09)
Total	2	2	3	3	1	11 (100%)

4.2 Manifestações Clínicas e Exames Laboratoriais

A taxa de mortalidade foi de 54,5% (6/11), ocorrendo óbito cerca de 12 a sete dias após o atendimento, e 45,4% (5/11) não retornaram ao Hospital Veterinário da Universidade de Santo Amaro para dar continuidade e acompanhamento do caso. Apenas 18,1% (2/11) apresentaram melhora clínica com o tratamento, sem alta clínica, pois não compareceu ao retorno agendado.

Ao exame físico e inspeção, a icterícia foi observada em oito casos (72,7%), tanto em mucosas, como em subcutâneo. Em sete casos (63,6%) foram comum a apresentação de desidratação de grau leve a intenso e apatia. Outros sintomas observados foram anorexia (81,8%), êmese (54,5%), oligúria e/ou anúria (45,4%), hematoquesia (36,3%), algia abdominal e petéquias (27,2%), hipertermia e hipotermia (9,09%) em apenas um caso cada.

Os resultados do hemograma estão descritos na Tabela 4. A contagem dos eritrócitos mostrou-se dentro dos valores de referência em seis casos (54,5%) e abaixo dos valores de referência em cinco casos (45,4%), indicando anemia normocítica normocrômica. Leucocitose por neutrofilia foi observado em dez casos (90,9%), enquanto que trombocitopenia foi comum em cinco casos (45,4%) e leucopenia observada em apenas um caso (9,09%). Apenas em um caso, obteve-se valores eritrocíticos que indicavam desidratação.

Os resultados da bioquímica sanguínea, apresentados na Tabela 5, revelaram aumento dos níveis séricos de ureia e creatinina em dez casos (90,9%) indicando azotemia, aumento dos níveis séricos da enzima fosfatase alcalina em sete casos (63,6%) e aumento da enzima alanina transaminase em seis casos (54,5%), ambas indicando comprometimento hepático. Outras alterações observadas foram hiperglicemia (45,4%), hiperglobulinemia e hipoalbuminemia (36,3%) e em apenas um caso observou-se hipoglicemia (9,09%).

4.3 Reação em Cadeia de Polimerase

Das dez amostras de urina analisadas pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com o objetivo de avaliar a presença de leptospiúria, identificando o DNA de leptospiras, nenhuma apresentou resultado positivo.

4.4 Isolamento

Das dez amostras de urina destinadas ao isolamento de *Leptospiras* spp. em meio de cultivo de Fletcher, armazenadas em estufa a 28-30°C durante seis semanas, com observações semanais, três (30%) contaminaram com outros microorganismos e sete (70%) resultaram em culturas negativas ao final de seis semanas por não apresentarem a formação do anel de crescimento subsuperficial de leptospiras no meio e descartadas quando observadas em microscopia de campo escuro.

Quadro 3 – Características e principais alterações clínicas encontradas nos 11 cães suspeitos de leptospirose atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Santo Amaro – HOVET/UNISA, São Paulo-SP, 2016

Parâmetro	Caso Clínico n°										
	1	2	6	7	8	9	10	11	12	13	16
Sexo	Fêmea	Fêmea	Macho	Macho	Fêmea	Fêmea	Macho	Macho	Macho	Macho	Fêmea
Raça	Lhasa Apso	SRD	SRD	SRD	SRD	Pinscher	Pinscher	SRD	Yorkshire	Pitbull	SRD
Sinais	Icterícia, petéquias, desidratado apatia, êmese, anorexia e polidipsia	Hipertermia icterícia, desidratado anorexia, aquesia, colúria, êmese, dispneia, hematomas	Mucosa hipocorada, apatia, vomito e fezes com sangue petéquias, dispneia	Mucosa hipocorada icterícia, dispneia	Anorexia, adipsia, fezes com sangue, êmese, icterícia, desidratado, dor em abdômen	Hipertermia, taquicardia, apatia, desidratação, icterícia, hiporexia, adipsia	Desidratado apatia, algia abdominal, êmese, diarreia, anorexia, adipsia, oligúria, mucosa congesta	Anorexia, êmese, icterícia, polidipsia, apatia	Apatia intensa, secreção ocular, abdômen abaulado, caquexia, anorexia, dispneia, linfonodos reativos, hálito urêmico, epistaxe	Apatia, anorexia, fezes com sangue, diarreia, anúria, êmese, icterícia, desidratado, abdômen tenso	Hipotermia, anorexia, polidipsia, fezes com sangue, icterícia, desidratação intensa, apatia, algia abdominal
Vacinação	Mais 24 meses	Mais 24 meses	Nenhuma	Atualizada	Nenhuma	Atualizada	Atualizada	Nenhuma	Mais 24 meses	Nenhuma	Mais 24 meses
Sorologia para leptospirose (Títulos)	3200 Copenhagueni	200 Icterohaemorrhagiae	800 Cynopteri	800 Cynopteri	1600 Copenhagueni	200 Cynopteri	100 Icterohaemorrhagiae	1600 Copenhagueni	100 Bratislava	800 Butembo	1600 Copenhagueni
Evolução	Apresentou melhora clínica e não retornou	Apresentou melhora clínica e não retornou	Óbito 24h após atendimento	Não retornou	Não retornou	Óbito 24h após atendimento	Óbito 7 dias após atendimento	Não retornou	Óbito 12h após atendimento	Óbito 5 dias após atendimento	Óbito 12h após atendimento

Tabela 4 – Hemograma dos 11 casos suspeitos para leptospirose atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Santo Amaro – HOVET/UNISA, São Paulo-SP, 2016

Parâmetro (Referência ⁵⁹)	Caso clínico n°										
	1	2	6	4	8	9	10	11	12	13	16
Hemácias (5,7 – 7,4 milhões μ l)	5,5	4,8	2,4	1,9	5,8	4,6	7,1	8,5	5,1	6,8	7,7
Hemoglobina (14 – 18 g/dl)	13,3	10,1	6,1	4,5	14,4	10,1	15,1	19,5	11,5	14,4	16,5
Hematócrito (37 – 47%)	38	30	18	13	42	30	47	63	36	45	51
VCM* (60 – 77 μ m ³)	69,1	62,5	75	68,4	72,4	65,2	66,2	74	70	65	65
CHCM* (32 – 36%)	35	33,7	33,9	34,3	34,2	33,7	32,1	31	31	32	32
Leucócitos (6 - 17 mil/ μ l)	22.500	32.000	200	72.200	41.600	70.400	19.200	48.000	60.000	16.600	28.600
Basófilos (0/ μ l)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Eosinófilos (150 -1350/ μ l)	0	640	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Metamielócitos (0/ μ l)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bastonetes (0 - 300/ μ l)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Segmentados (3 - 11,5 mil/ μ l)	20.925	24.640	-	21.648	29.536	49.280	15.936	45.120	55.900	14.276	26.598
Linfócitos (1 - 4,8 mil/ μ l)	675	3.200	-	3.168	7.488	11,264	1.920	2.400	4.256	996	1.430
Monócitos (150 - 1.350/ μ l)	900	3.520	0	1.584	4.576	7.744	1.344	480	608	1.328	572
Plaquetas (200 – 500 mil/mm ³)	310.000	213.000	40.000	Agregadas	215.000	70.100	240.000	212.000	80.000	103.000	41.000

*VCM: Volume corpuscular médio; *CHCM: Concentração de hemoglobina média

Tabela 5 – Exame bioquímico dos 11 animais reagentes no teste sorológico (SAM) atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Santo Amaro – HOVET/UNISA, São Paulo-SP, 2016

Parâmetro (Referência ⁵⁹)	Caso clínico n°										
	1	2	6	7	8	9	10	11	12	13	16
Uréia (15 - 40 mg/dl)	110,7	132,0	258,7	88,3	65,7	65,7	444,6	-	265,0	280,00	-
Creatinina (1 - 2 mg/dl)	2,94	1,1	2,35	0,64	6,4	0,5	16,8	-	0,92	5,7	4,26
Proteína Total (5,5 - 7,7 g/l)	7,6	7,3	8,6	8,9	7,2	6,6	5,2	-	8,1	9,6	-
Albumina (2,3 - 3,8 g/l)	2,2	1,4	1,2	3	2,5	1,8	3	-	1,4	2,7	-
ALT (70 - 92 U/l)	155,2	235,7	26,1	183,3	589,8	36,6	52,3	-	73,3	235,7	241
FA (10 - 96 U/l)	1.725	804,3	207,3	149,3	1.015	215,6	41,4	-	132,7	560,1	877
Glicose (70 - 110 mg/dl)	97	118	86	33	145	118	81	122	117	93	-

5 DISCUSSÃO

Considerando como uma resposta sorológica reagente aquela que apresentou títulos maiores ou iguais a 100, dos 18 soros examinados, 11 foram sororreagentes (61,1%) para a leptospirose com títulos variando de 100 a 3200. Em relação a distribuição dos sorovares, verificou-se um predomínio de sororreatividade para o sorovar Copenhageni, com quatro amostras reativas (36,6%), seguido de Cynopteri, com três (27,7%), Icterohaemorrhagiae com duas (18,1%) e com apenas uma amostra cada, os sorovares Bratislava e Butembo (9,09%).

A frequência de aglutininas antileptospiras encontrada por Zacarias et al.⁶⁰, na cidade de Bandeirantes-PR, foi de 25,71%, tendo o sorovar Canicola como mais prevalente, que não está presente nos resultados desse trabalho. Rodrigues et al.⁶¹, encontraram prevalências de 80% em São Paulo, apresentando o sorovar Copenhageni com sororreatividade de 50%, excedendo os resultados os presentes resultados. Wolffenbuttel et al.²⁵, também obteve o sorovar Copenhageni como o mais prevalente em cinco, dos sete casos clínicos examinados.

A prevalência do sorovar Copenhageni encontrado nessa pesquisa destaca a importância da utilização de vacinas que contenham este sorovar na formulação. Este sorovar não está incluído na maioria das vacinas comerciais disponíveis. Os sorovares mais frequentes nas vacinas para cães são Icterohaemorrhagiae, Canicola, Grippotyphosa e Pomona⁴⁸.

Outros autores, como Ferreira et al.³¹, em Uberlândia - M G, analisaram 236 amostras sanguíneas de bovinos, equinos e cães, obtendo uma soropositividade para o sorovar Copenhageni de 36,2% e Tesseroli et al.¹⁵, em Curitiba – PR, encontraram 71,5% de reagentes para o mesmo sorovar, das 598 amostras de cães examinadas. Sugerindo que as leptospiras circulam entre os animais de companhia, mais especificamente nos cães. Estes animais apresentam grande importância na cadeia epidemiológica da leptospirose humana devido a sua proximidade com o homem.

A presença do sorovar Copenhageni destaca a importância do controle de roedores, pois são considerados hospedeiros naturais deste sorovar. Em períodos

de altas concentrações pluviométricas, anualmente, no Brasil, são notificados surtos epidêmicos para leptospirose humana, onde 80% destes estão relacionados ao sorovar Copenhageni²¹.

O sorovar Cynopteri, ocorreu em três dos 11 cães analisados neste estudo, sendo o segundo mais prevalente. Tealdo et al.⁶², obtiveram nos seus resultados a maior prevalência para este sorovar, sendo que dos 37 animais positivos, 59% destes foram reagentes para esse sorovar. A alta prevalência para o Cynopteri surpreende, uma vez que tem sido encontrado apenas em testes sorológicos realizados em animais selvagens, como os gambas, leões marinhos e raposas

O sorovar Icterohaemorrhagiae, o terceiro mais encontrado nesse estudo, foi o mais prevalente em uma pesquisa realizada por Freire et al.⁶³, onde verificou-se alto predomínio para este sorovar (50%) em 120 amostras de soro canino, na cidade do Rio de Janeiro – RJ. No entanto, Favero et al.²⁴, obtiveram 10,9% de reatividade para o sorovar Icterohaemorrhagiae, sendo o segundo mais prevalente em 983 cães analisados em diversas cidades brasileiras.

O sorovar Bratislava foi encontrado em equinos e suínos, por Pinna et al.⁶⁴, e Bolin et al.⁶⁵, com frequência de 51,4% (72/140) e 94,1% (16/17), respectivamente. Ambos os autores relatam que alterações reprodutivas foram os principais sinais encontrados nos animais reagentes ao sorovar Bratislava.

Segundo Tonin et al.⁶⁶, o sorovar Butembo é um dos mais prevalentes no estado de Santa Catarina em bovinos, atentando-se para a saúde pública, manejo sanitário e produção animal, já que este sorovar não está presente nas vacinas comerciais e pode causar problemas reprodutivos como infertilidade.

As alterações consideradas clássicas da leptospirose incluem anemia, leucocitose, neutrofilia, trombocitopenia e icterícia⁴⁰. Porém, alguns cães podem não apresentar estas alterações tornando o diagnóstico laboratorial essencial para iniciar a terapia específica e eliminar possíveis portadores³³. Balassiano et al.⁶⁷, em um estudo onde foram relatados casos de leptospirose anictérica em aguadores de arroz da região Sul do Brasil também afirma que o diagnóstico correto é de extrema importância. Casos com manifestações clínicas não clássicas da doença, como a forma anictérica são uma das razões para a subnotificação da leptospirose.

Na fase de leptospiremia superaguda, pode haver leucopenia, enquanto que, na fase crônica, encontra-se leucocitose com ou sem desvio a esquerda. A trombocitopenia, diminuição dos níveis séricos das plaquetas, pode ser observada durante todo o quadro da doença⁶⁸.

As alterações na hematologia encontradas em cinco casos do presente estudo como anemia normocítica normocrômica e trombocitopenia podem ser explicados devido a hemólise intravascular e vasculite que podem causar hemorragias e conseqüentemente aumento no consumo de plaquetas^{40,36}. A trombocitopenia, foi o único achado no estudo realizado por Castro, et al. 2014³² em 21 cães, dos 140 analisados e a anemia e leucocitose não foram um achado neste estudo, porém estes dados podem ser explicados por se tratar de um estudo realizado com cães assintomáticos, no entanto essas alterações, foram encontradas por Mendonça et al.⁶⁹.

O comprometimento renal foi avaliado através da mensuração dos níveis séricos de ureia, sintetizada no fígado e creatinina, originada do metabolismo muscular, estas substâncias são indicadores da filtração glomerular que após filtradas são excretadas na urina²⁸. Os níveis séricos de ureia, e creatinina foram frequentes neste trabalho, pois encontraram-se aumentados em dez dos 11 casos reagentes, indicando que o animal estava em azotemia e conseqüentemente uremia. Resultados também encontrados em 86% dos sete cães suspeitos analisados por Wolffenbütel et al.²⁵, por Vieira et al.⁷⁰, em 30/94 cães avaliados em Uberlândia-MG e por Kogica et al⁷¹.

As alterações hepáticas são caracterizadas pelo aumento dos níveis séricos de algumas enzimas, como a FA e ALT e alguns outros parâmetros bioquímicos, sendo frequente nos casos de leptospirose ^{37,48}. No presente estudo, essas alterações foram frequentes, onde 6/11 apresentaram aumento nos níveis de ALT e 9/11 animais para a enzima FA. Discordando da pesquisa realizada por Freire et al.⁴⁵, onde apenas foi encontrado alterações na FA, sugerindo um quadro de colestase.

Os achados clínicos e laboratoriais que foram encontrados nos cães positivos ao teste de SAM para leptospirose neste trabalho, mostraram um acometimento vascular, renal e hepático, representados pelas manifestações clínicas e pelos níveis

séricos de hemácias e do hematócrito, que encontravam-se diminuídos, indicando anemia. Foram encontrados valores de ureia e creatinina aumentados, sugestivos de insuficiência renal aguda, bem como de ALT e FA, que avaliam o comprometimento hepático indicando uma inflamação hepatocelular e/ou colestase. Estes achados são comumente encontrados nos casos de leptospirose^{36,48}. Alterações semelhantes também foram registrados por Costa et al.⁷², Mendonça et al.⁶⁹, Langoni et al.⁷³, Castro et al.³³, Oliveira et al.⁷⁴, em estudos realizados nas cidades de Sobral-CE, Curitiba-PR, Botucatu-SP, Uberlândia-MG e Londrina-PR, respectivamente.

No presente estudo, as dificuldades de isolamento podem ser explicadas, principalmente, devido a leptospiúria intermitente e a necessidade de iniciar o tratamento com os antibióticos o mais rápido possível, diminuindo assim a quantidade de leptospiros eliminadas na urina, o que torna as amostras de urina pouco viáveis para o diagnóstico. Outros fatores que contribuem para o insucesso do isolado são: tempo e armazenamento da amostra entre coleta e processamento, necessidade de um longo período de incubação e presença de contaminantes⁴⁸. Nos estudos realizados por Rodrigues⁷⁵, e Tozzi et al.⁷⁶, também relataram dificuldades de isolamento, obtendo apenas quatro isolamentos das 29 amostras e apenas dois isolamentos de 24 amostra processadas, respectivamente. Freitas et al.⁷⁷, obteve um êxito maior, onde 11/14 isolamentos foram positivos.

O insucesso na amplificação do DNA com a técnica de PCR pode ocorrer devido a lise da parede celular de algumas bactérias, inclusive da leptospira, ao modo de congelamento e descongelamento, armazenamento em baixas temperaturas, estocagem em meios ácidos ou pelo contato com substâncias interferentes, como sangue, células e até mesmo a ureia e creatinina em altas concentrações na urina inibem a reação de PCR^{78,79}. Existe ainda a possibilidade da alíquota usada para o procedimento não apresentar o agente, pois sua excreção na urina é intermitente e o seu material genético pode ser degradado no armazenamento ou ser disperso junto ao sobrenadante no processo de centrifugação^{36,78}. Meira⁸⁰ analisou 15 amostras de urina de cães, onde apenas dois foram positivos divergindo de Correia et al.⁸¹, que obteve resultado mais significativo com 38,8% (226/582) de amostras positivas de urina de bovinos, da região do Rio de Janeiro – Brasil.

6 CONCLUSÃO

Das 18 amostras de soros caninos com suspeitas de leptospirose analisadas, 11 foram sororreagentes pela técnica de SAM tendo como sorovar predominante o Copenhageni o que sugere a participação de roedores sinantrópicos como fonte de infecção para os cães, porém a presença do agente etiológico não foi confirmada nas amostras de urina submetidas à técnica de PCR e de isolamento de leptospiras.

Os resultados obtidos reforçam a importância de realização de programas de controle aos roedores, medidas preventivas, como modificações ambientais, medidas sanitárias e educação em saúde. Ressalta-se também a importância do desenvolvimento e uso de vacinas que contenham este sorovar na sua formulação.

REFERÊNCIAS

1. Kalin M, Devaux C, Difruscia R, Lemay S, Higgins R, Three cases of canine leptopiresis in Quebec. *Can Vet J.* v. 40, p. 187-191, 1999.
2. Ministério da Saúde (Brasil). Programa de Zoonoses Região Sul. Manual de Zoonoses. Brasília: Ministério da Saúde; 2009. 103p.
3. Levett PN. Leptospirosis. *Clinical Microbiology reviews.* 2001; 14(2): 296-326.
4. World Health Organization. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. 2003. Disponível em: <http://www.who.int/csr/don/en/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.23.pdf>. Acessado em: 16 de jun. 2016.
5. Batista CSA, Azevedo SS, Alves CJ, Vasconcellos SA, Moraes ZM, Clementine IJ, et al. Soroprevalência de Leptospirose em cães errantes da cidade de PATOS, Estado da Paraíba, Brasil. *Braz J vet Res anim Sci.* 2004; 41(2): 131-136.
6. Genovez ME. Leptospirose: Uma doença de ocorrência além da época das chuvas. *Biológico, São Paulo.* 2009; 71(1):1-3.
7. Ministério da Saúde (Brasil). Secretária de Vigilância em Saúde. Doenças infecciosas e Parasitárias: Guia de bolso. 8 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.
8. Ministério da Saúde (Brasil). Secretaria da Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. 6 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005.
9. Ministério da Saúde (Brasil). Secretária da Vigilância em Saúde. Leptospirose: diagnóstico e manejo clínico. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.
10. Vasconcelos CH, Fonseca FR, Lise MLZ, Arsky MLNS. Fatores ambientais e socioeconômicos relacionados à distribuição de casos de leptospirose no Estado de Pernambuco, Brasil, 2001-2009. *Cad. Saúde Colet.* 2012; 20(1): 49-56.
11. Portal da Saúde. Ministério da Saúde. Casos confirmados e óbitos por leptospirose de 2000 a 2016. Acesso em: 23 de out. 2016. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados>>.

12. Langoni H. Leptospirose: aspectos de saúde animal e de saúde pública. Revista de Educação Continuada do CRMV-SP. 1999; 2(1): 52-58.
13. Castro JR, Salaberry SRS, Souza MA, Lima-Ribeiro AMC. Sorovares de leptospiras spp. predominantes em exames sorológicos de caninos e humanos no município de Uberlândia, Estado de Minas Gerais. Vet Soc Bras Trop. 2011; 44(2): 217-222. DOI: 10.1590/S0037-86822011005000012.
14. Jouglard SDD, Brod CS. Leptospirose em cães: prevalência e fatores de risco no meio rural do Município de Pelotas, RS. Arq Inst Biol. 2000; 67(2): 181-185.
15. Teserolli GL, Alberti JVA, Bergamaschi C, Fayzano L, Agottani JVB. Principais sorovares de leptospirose canina em Curitiba, Paraná. Pubvet. 2008; 2(21): 1-8.
16. Modolo JR, Langoni H, Padovani CR, Shimabukuro FH, Mendonça AO, Victoria C et al. Investigação soroepidemiológica de leptospirose canina na área territorial urbana de Botucatu, São Paulo, Brasil. Braz. J. vet. Res. Anim. Sci. 2006; 43(5): 598-604.
17. Sarmiento AMC, Guazelli A, Barreto LFG, Costa VM, Hoffmann JL, Lucheis SB, et al. Estudo da Leptospirose em cães e gatos, da Leishmaniose e da Doença de Chagas em cães de aldeias indígenas guaranis em Parelheiros, Município de São Paulo-SP. Vet. e Zootec. 2007; 14(2): 193-203.
18. Mascoll R, Pinheiro SR, Vasconcellos AS, Ferreira F, Morais ZM, Pinto CO, et al. Inquérito sorológico para Leptospirose em cães do Município de Santana de Parnaíba, São Paulo, utilizando a campanha de vacinação antirrábica do ano de 1999. Arq. Inst. Biol. 2002; 69(2): 25-32.
19. World Health Organization. Current problems in leptospirosis research. Wld. Hlth. Org. techn. Rep. Ser. 1967; 380: 1-34.
20. Ministério da Saúde (Brasil). Secretária da Vigilância em Saúde. Leptospirose: diagnóstico e manejo clínico. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.
21. Genovez ME. Leptospirose em animais de Produção. In: Megid J, Ribeiro MG, Paes, AC. Doenças Infecciosas dos em Animais de produção e de Companhia. Rio de Janeiro: Roca; 2016. p. 378-387.

22. Blazius RD, Romão PRT, Blazius EMCG, Silva OS. Ocorrência de cães errantes soropositivos para leptospirose spp. na cidade de Itapema, Santa Catarina, Brasil. Cad. Saúde Pública, RJ. 2005; 21(6): 1952-1956.
23. Hagiwara, MK. Boletim Técnico: Leptospirose canina. Pfizer Saúde Animal. 2003. p. 1-6.
24. Favero ACM, Pinheiro SR, Vasconcellos SA, Morais ZM, Ferreira F, Neto, JSF. Sorovares de leptospirosas predominantes em exames sorológicos de bubalinos, ovinos, caprinos, equinos, suínos e cães de diversos estados brasileiros. Ciência Rural, Santa Maria. 2002; 32(4): 613-619.
25. Wolffenbüttel S, Scheeffler J, González FHD, Schmidt V, Oliveira RT. Achados clínico-laboratoriais em sete cães com resposta sorológica à leptospirose. MEDVEP Rev Cientif Med Vet Pequenos Anim Estim. 2004; 2(5): 44-50.
26. Lopes ALS, Silva WB, Padovani CR, Langoni H, Modolo JR. Frequência sorológica antileptospírica em cães: sua correlação com roedores e fatores ambientais, em área territorial urbana. Arq Inst Biol, São Paulo. 2005; 72(3): 289-296.
27. Batista CSA, Alves CJ, Azevedo SS, Vasconcellos SA, Morais ZM, Clementino IJ, et al. Soroprevalência e fatores de risco para a leptospirose em cães de Campina Grande, Paraíba. Arq Bras Vet Zootec. 2005; 57(2): 179-185.
28. Freire IMA, Vargues RG, Gomes YNP, Pombo CR, Lilenbaum. Distribuição dos sorovares de leptospirosas em caninos clinicamente suspeitos no Rio de Janeiro. Rev Bras Ci Vet. 2014; 14(2): 83-85.
29. Freire IMA, Vargues R, Lilenbaum. Níveis séricos de uréia e creatinina em cães com leptospirose aguda determinada por amostras do sorogrupo Icterohaemorrhagiae. Ciência Rural, Santa Maria. 2008; 38(4): 1172-1175.
30. Lemos JP, Melo CB, Viegas SARA. Análise sorológica de *Leptospira* spp. em cães errantes no município de Aracajú. Resv Ci Elet Med Vet. 2010; 14: 3-16.
31. Ferreira BC, Lima-Ribeiro AMC, Medeiros AA, Tavares TCF, Gomes DO, Souza MA, et al. Frequência de animais sororreagentes para *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni. Vet Not. 2012; 18(2): 41-44.

32. Negrão DD, Gonçalves D. Incidência de leptospirose em cães errantes acolhidos no centro de controle e zoonoses de Curitiba. *Rev Elet Fac Evan Par, Cur.* 2012; 2(4): 63-68.
33. Castro JR, Silva CB, Souza MA, Salaberry SRS, Guimarães ED, Mundim V, et al. Alterações hematológicas em cães naturalmente infectados por leptospira spp., *Brucella abortus* e *Brucella canis*. *Vet Bras Med Vet.* 2014; 36(1): 48-54.
34. Alves CJ, Clementino IJ, Oliveira AGF, Freitas TF, Vasconcellos SA, Morais ZM. Avaliação dos níveis de albugininas antileptospira em cães de caça na Paraíba, Brasil. *Ver Bras Ci Vet.* 2014; 11(1-2): 68-73.
35. Inada R, Ido Y, Hoki R, Kaneko R, Ito H. The etiology, mode of infection, and specific therapy of Weil's disease (spirochaetosis icterohaemorrhagica). *The Journal of experimental medicine.* 1916; 23(3): 377-402.
36. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira and Leptospirosis.* 3. Ed. Melbourne: MediSei; 1999. p. 272.
37. Hagiwara MK, Lustosa M, Kogika MM. Leptospirose canina. *Vet News.* 2004; 67: 1-2.
38. Faine S. Guidelines for the control of Leptospirosis. Geneva. World health Organization. 1982. p. 100.
39. The leptospirosis Information Center. [Acesso em: 01 de nov. 2016]. Disponível em: <<http://www.leptospirosis.org>>.
40. Greene CE, Miller MA, Brown CA. Leptospirosis. In: Greene CE. *Infectious diseases of the dog and cat.* 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders. 1998; p. 273-281.
41. OIE – World Organization for Animal Health. Leptospirosis. [Chapter 2.1.9]. 2008
42. Marshall RB. The route of entry of leptospiras into the kidney tubule. *Journal of medical microbiology.* 1975; 992): 149-152

43. Bal AE, Gravekamp C, Hartskeerl RA, Brewster JM, Horver H, Terpstra WJ. Detection of leptospirosis in irune by PCR for eraly diagnosis of leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 1994; 32(8): 1894-1898.
44. Acha PN, Szyfres B. Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales. Organizacion Panamericana de La Salud. 3. ed. Washington, 2003; p. 175-185.
45. Freire IMA, Varges R, Lilenbaum. Alterações na bioquímica hepática em cães com leptospirose aguda determinada por amostras do sorogrupo *Icterohaemorrhagiae*. *Ciência rural*, Santa Maria. 2008; 38(9): 2630-2632.
46. WHO – World health Organization. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. 2003. p. 1-122.
47. Oliveira, MAA. Diagnóstico laboratorial de leptospirose: triagem e confirmação. [Acesso em: 06 de nov. 2016]. Disponível em: <<http://slideplayer.com.br/slide/2335991/>>.
48. Paes AC. Leptospirose canina. In: Megid J, Ribeiro MG, Paes, AC. *Doenças Infecciosas dos em Animais de produção e de Companhia*. Rio de Janeiro: Roca; 2016. p. 356-377
49. Tonin AA, Azevedo MI, Santos LG, Silva AS, Badke MRT, Martins LR, et al. Sulfato de estreptomicina como auxiliar no tratamento de leptospirose melhorando índices reprodutivos em bovinocultura de leite. *Acta Vet Bras*. 2009; 3(3): 166-170.
50. Girio TMS, Magajevski FS, Girio RJS, Miashyro S, Rodrigues LH, Scarcelli EP et al. Uso de estreptomicina na eliminação da leptospiúria em touros (*bos taurus indicus*) naturalmente infectados pelo sorovar Hardjo. *Arq. Inst. Biol*. 2005; 72(2): 161-170.
51. Santos GO, Cardoso F, Vasconcellos AS, Morais ZM, Cortez A, Fávero ACM, et al. Emprego do ceftiofur sódico ou da estreptomicina para a terapia da leptospirose em hamsters experimentalmente infectados com o sorovar Pomona. *Arq. Inst. Biol*. 2001; 68(1): 1-8.
52. Andrade SF, Giuffrida R, Ribeiro MG. Quimioterápicos Antimicrobianos e Antibióticos. In: Andrade SF. *Manual de terapêutica Veterinária*. 3 ed. São Paulo: Roca. 2002; p. 13-500.

53. Ristow P, Lilenbaum W. Leptospirose: atualização e perspectivas. *Microbiologia in foco*, São Paulo, 2010. p. 17-27.
54. Castro JR, Salaberry SRS, Neto BC, Ávila DF, Souza MA, Lima-Ribeiro AMC. Leptospirose canina – Revisão de literatura. Ed 136. Londrina: PUBVET. 2010.
55. Alves CJ, Vasconcellos SA, Camargo CRA, Moraes ZM. Influência de fatores ambientais na proporção de caprinos soro-reagentes para a leptospirose em cinco centros de criação do Estado da Paraíba. *Arq Inst Biol, SP*. 1995; 63(2): 11-18.
56. Myers DM. Manual de métodos, para el diagnóstico de laboratorio de la leptospirosis. Martinez: OPAS, Centro Panamericano de Zoonosis, 1985.
57. Favero ACM, Mangerona ACS, Alessi LJ, Moraes ZM, Pinheiro SR, Ferreira NJS, et al. Aglutininas pós-vacinas em bovinos imunizados com bacterina tetravalente contra leptospirose Influência de reações pré-vacinais, homólogas e heterólogas. *Arq Inst Biol, SP*. 1997; 64(2): 45-55.
58. Mérien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G, Saint Giron I. Polymera Chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *Jour Clin Microb*. 1992; 30: 2219-2224.
59. Meyer DJ, Coles EH, Rich Lj. *Medicina de laboratorio veterinária: interpretação e diagnóstico*. São Paulo: Roca, 1995. p. 308.
60. Zacarias FGS, Marques DRC, Cardoso MJL, Freitas JC, Junior AZ, Zamarian TP. Frequência de anticorpos anti-leptospira spp. em cães atendidos no hospital veterinário da universidade estadual do norte do Paraná – UENP. *Arq Ciênc Vet Zool*. 2014; 14(2): 91-95;
61. Rodrigues AMA, Vasconcellos SA, Moraes ZM, Hagiwara MK. Isolamento de leptospira spp. de cães com diagnóstico clínico de leptospirose em São Paulo (Brasil). *Acta Scientiae Veterinariae*. 2007; 35(2): s705-s706.
62. Tealdo MS, Romero GN, Autrey CD, Samartino L. Serología positiva a *Leptospira interrogans*, serovar cynopteri em caninos de la Ciudad d Buenos Aires, Argentina. *InVet*. 2007; 9(1): 59-65.

63. Freire IMA, Vargês RG, Gomes YNP, Pombo CR, Lilenbaum W. Distribuição de serovares de leptospira em caninos clinicamente suspeitos no Rio de Janeiro. *Ver Bras Ci Vet.* 2007; 14(2): 83-85.
64. Pinna M, Martins G, Freire I, Lilenbaum W. Seropositivity to *Leptospira interrogans* serovar Bratislava associated to reproductive problems without significant biochemical or hematological alterations in horses. *Ciênc Rur, Santa Maria.* 2010; 40(10): 2214-2217.
65. Bolin CA, Cassells, JÁ, Hill HT, Frantz JC, Nielsen JN. Reproductive failure associated with *Leptospira interrogans* serovar Bratislava infection of swine. *J Vet Diagn Invest.* 1991; 3: 152-154.
66. Tonin AA, Azevedo MI, Escobar TP, Cassassola I, Santos LG, Silva AS, et al. Leptospirose bovina: aumento da incidência da *Leptospira interrogans* sorovar Butembo no rebanho do estado de Santa Catarina, Brasil. *Acta Vet Bras.* 2010; 4(4): 294-297.
67. Balassiano It, Vital-Brasil JM, Barbosa ATL, Moraes SR, Marchry L, Timm NL, et al. Aspectos clínicos de leptospirose anictérica em plantador de arroz na região sul do Brasil. *Ver Sal, Vassouras.* 2011; 29(1): 61-66.
68. Nelson RW, Couto GC. Manual de medicina interna de pequenos animais. 2 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2006. p. 1103.
69. Mendonça RO, Vieira DL, Castro LLD, Joaquim SF, Latosinski GS, Molento MB. Alterações hematológicas e bioquímicas em cães infectados por leptospirosas spp. Relato de caso. *Anclipeva.* 2015; 14(72): 1472-1476.
70. Vieira AM, Rezende LM, Oliveira LD, Tavares TCF, Gomes DO, Lima-Ribeiro AMC. Alterações hematológicas e bioquímicas de cães reagentes para *Leptospira* spp. *Med Vet & Zoot.* 2008; 80-81.
71. Kogica MN, Hagiwara, MK, Miranbola RMS. Alterações bioquímicas na leptospirose canina. *Braz J Vet Res Anim Sci, São Paulo.* 1990; 27(2): 177-182.
72. Costa ERA, Honorato RA, Fiuza RF, Leite AKRM. Alterações hematológicas, morfológicas sanguíneas e bioquímicas em um cão com leptospirose. *Ver Cient Elet Med Vet.* 2013; 21: 1-10.

73. Langoni H, Silva AV, Segismundo R, Lucheis SB, Paes AC. Variáveis epidemiológicas e alterações clínicas, hematológicas e urinárias em cães sororreagentes para *Leptospira* spp. *Cien Agrá, Londrina*. 2013; 34(2): 765-776.
74. Oliveira RC, Freitas JC, Silva FG, Souza EM, Delbem ACB, Alves LA, et al. Diagnóstico laboratorial da leptospirose em um cão utilizando diferentes técnicas. *Arq Inst Biol, SP*. 2005; 72(1): 111-113.
75. Rodrigues AMA. Leptospirose canina: diagnóstico etiológico, sorológico e molecular e avaliação da proteção cruzada entre os sorovares Icterohaemorrhagiae e Copenhageni [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo; 2008.
76. Tozzi BF, Miotto BA, Penteado MS, Hagiwara MK. Isolamento e identificação de leptospirosas patogênicas em cães com suspeita clínica de leptospirose. *Med Vet & Zoot*. 2015; 96-97.
77. Freitas JC, Silva FG, Oliveira RC, Delbem ACB, Muller EE, Alves LC, et al. Isolation of leptospira spp from dogs, bovine and swine naturally infectec. *Ciênc Rur, Santa Maria*. 2004; 34(3): 853-856.
78. Lucchesi PM, Arroyo GH, Etcheverria AI, Parma AE, Seijo AC. Recommendations for the detection of leptosóira in urine by PCR. *Ver Soc Bras Med TROP*. 2004; 37: 131-4.
79. Boom VVD, Citterio E, Hoogstraten D, Zotter A, Egly JM, Cappelen WA, et al. DNA damage stabilizes interaction of CSB with the transcription elongation machinery. *The Jour of Cell Biol*. 2004; 166(1): 27-36
80. Meira CD. Detecção molecular de leptospira em amostras de urina de cães infectados naturalmente. *Vet e Zootec*. 2011; 18(2): 249-254.
81. Correia L, Loureiro AP, Lilenbaum W. A influência da sazonalidade na manutenção da leptospirose bovina no Rio de Janeiro, Brasil. *Med Vet & Zootec*. 2015; p. 90.

APÊNDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pesquisadores responsáveis: Amane Gonçalves, Adriana Cortez, Celso Pinto, Rafael Agopian, Valéria Castilho Onofrio.

Telefone para contato: (11)21418562

Sua colaboração é importante e necessária para o desenvolvimento da pesquisa.

- A pesquisa analisa a ocorrência de doenças infecciosas em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Santo Amaro (HOVET-UNISA), e será realizada através da coleta de sangue e urina do animal;
- Você poderá solicitar informações ou esclarecimentos sobre o andamento da pesquisa em qualquer momento com o pesquisador responsável, sendo o resultado do exame informado por e-mail ou telefone;
- Sendo um participante voluntário, você não terá nenhum pagamento e/ou despesa referente à sua participação no estudo;

Eu, _____ como voluntária da pesquisa, afirmo que fui devidamente informada respeito dos procedimentos a serem realizados para colheita de material biológico (sangue e urina) com o animal acima identificado, o qual sou responsável e proprietário de seu domicílio, e reconheço ainda a importância deste trabalho para o controle das doenças transmissíveis desta região, bem como para a saúde do animal sob meus cuidados. Meu nome não será divulgado de forma nenhuma e terei a opção de retirar meu consentimento a qualquer momento.

São Paulo, ____ de _____ de 201__

(Assinatura do representante legal (proprietário) do sujeito de pesquisa)

Assinatura do pesquisador