

UNIVERSIDADE SANTO AMARO

Curso de Medicina Veterinária

Gabriele Yumi Ramalho

**Diagnóstico sorológico, molecular e microbiológico de leptospirose
em cães com suspeita clínica aguda atendidos no Hospital
Veterinário da Universidade Santo Amaro**

São Paulo

2024

Gabriele Yumi Ramalho

**Diagnóstico sorológico, molecular e microbiológico de leptospirose
em cães com suspeita clínica aguda atendidos no Hospital
Veterinário da Universidade Santo Amaro**

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

Orientador: Prof. Dr. Bruno Alonso Miotto

**São Paulo
2024**

R135d

Ramalho, Gabriele Yumi.

Diagnóstico sorológico, molecular e microbiológico de leptospirose em cães com suspeita clínica aguda atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Santo Amaro / Gabriele Yumi Ramalho. – São Paulo, 2024.

38 p. : il., P&B.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Alonso Miotto.

TCC Graduação. (Curso Superior em Medicina Veterinária) – Universidade Santo Amaro, 2024.

Bibliografia incluída.

1. Leptospirose canina. 2. PCR. 3. Soroaglutinação microscópica.
I. Miotto, Bruno Alonso, orient. II. Universidade Santo Amaro. III. Título.

CDD 636.7

Elaborada pela Bibliotecária: Elisângela Silva Herênio CRB-8/6839

Gabriele Yumi Ramalho

**Diagnóstico sorológico, molecular e microbiológico de leptospirose
em cães com suspeita clínica aguda atendidos no Hospital
Veterinário da Universidade Santo Amaro**

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

Orientador: Prof. Dr. Bruno Alonso Miotto

São Paulo, 3 dezembro de 2024

Banca Examinadora

Prof. Dr. Bruno Alonso Miotto

Profa. Dra. Stephanie Esteves

Conceito Final: _____

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer:

Aos meus pais, por sempre acreditarem nos meus sonhos.

Ao meu irmão, por viver todos eles comigo.

Aos meus amigos, por serem a melhor rede de apoio.

Ao meu professor orientador, que me ensinou o que é ser um pesquisador de verdade.

Aos meus colegas de laboratório, eu nunca teria conseguido isso sozinha.

Aos meus demais professores durante o curso, vocês foram a minha maior inspiração.

Aos meus orientadores durante estágios, que me incentivaram a estudar e tentar ainda mais.

Aos meus animais de estimação: Chibi, Mel, Suri, Hachi e Yuki, vocês me colocaram nesse curso.

"If you want to be a grocer, or a general, or a politician, or a judge, you will invariably become it; that is your punishment. If you never know what you want to be, if you live what some might call the dynamic life but what I will call the artistic life, if each day you are unsure of who you are and what you know you will never become anything, and that is your reward"

- Oscar Wilde

RESUMO

A leptospirose é uma zoonose bacteriana de distribuição mundial, potencialmente letal e capaz de causar surtos epidêmicos em animais domésticos e populações humanas. Cães infectados podem atuar como importante fonte de infecção para populações humanas, por sua capacidade de eliminar o patógeno no ambiente via fluidos corporais e urina. Desta forma, a identificação de animais infectados, possibilitada principalmente com o uso de múltiplas técnicas diagnósticas, é essencial para auxiliar na implementação de medidas preventivas visando o impacto na Saúde Pública. Mesmo diante da confirmação do diagnóstico, somente o isolamento do agente permite a caracterização de estirpes circulantes, possibilitando a comercialização de vacinas que contém sorovariedades e assim garantindo a imunoprofilaxia eficaz de populações susceptíveis. O objetivo do estudo foi a abordagem de múltiplas técnicas diagnósticas em cães com suspeita de leptospirose aguda atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Santo Amaro. Amostras de sangue e urina foram coletadas e destinadas ao cultivo de leptospiros e detecção molecular do agente por meio da PCR. Amostras de soro foram utilizadas na investigação de anticorpos antileptospiros por meio da técnica de soroaglutinação microscópica. Foram atendidos 24 animais, entre eles, 6 (25%) diagnosticados pela técnica MAT, 8 (33,3%) obtiveram os resultados pela amplificação do gene 16S e 2 (8,3%) apresentaram crescimento bacteriano. A comparação entre resultados demonstrou que 4 (16,6%) foram diagnosticados exclusivamente pela MAT e 7 (29,1%) somente pela PCR, 1 (4,1%) foi positivo para ambos os testes e 1 (4,1%) confirmado pelos testes de MAT, PCR e cultura bacteriana.

Palavras-chave: Leptospirose canina, diagnóstico, infecção aguda

ABSTRACT

Leptospirosis is a worldwide spread bacterial zoonosis, potentially lethal and capable of causing epidemic surges in domestic animals and human populations. Infected dogs may act as an important infection source for human populations, because of its capabilities in eliminating environment pathogens by corporal fluids and urine. That way, the identification of infected animals, mainly possible by using multiple diagnostic techniques, is essential to aid in preventive measures implementations aiming the impact in Public Health. Even up diagnosis confirmations, solely the isolation of the agent enable the characterization of circulating stirpes, allowing the commercialization of vaccines which contains serovarities, granting effective imunoprophylaxys in susceptible populations. The objective of the study was to approach multiple diagnosis techniques in suspected acute leptospirosis infected dogs at Veterinary Hospital of Santo Amaro University. Blood and urine samples were collected and intended to leptospires cultivation and agent molecular detection by PCR. Serum samples were used in antileptospires antibodies through microscopic serumagglutination techniques. 24 dogs were attended, among them, 6 (25%) were diagnosed by MAT technique, 8 (33,3%) got results by gene 16S amplification and 2 (8,3%) presented bacterial growth. The comparasion between results showed that 4 (16,6%) were diagnosed exclusively by MAT and 7 (29,1%) only by PCR, 1 (4,1%) was positive for both tests and 1 (4,1%) confirmed by MAT, PCR and bacterial culture tests.

Keywords: Canine leptospirosis, diagnostic, acute infection

Lista de Tabelas

Quadro 1 - Variantes sorológicas utilizadas na MAT. Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Universidade de São Paulo (VPS-USP), 2024.....25

Tabela 1 - Resultados de Soroaglutinação Microscópica, PCR, sequenciamento e isolamento de 24 cães atendidos no HOVET-UNISA com suspeita clínica de leptospirose aguda entre fevereiro de 2024 até dezembro de 2024.....29

Sumário

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1. Etiologia e classificação	14
2.2. Epidemiologia	15
2.3. Patogênese e sinais clínicos	16
2.4. Diagnóstico	16
2.4.1. Soroaglutinação Microscópica (MAT)	18
2.4.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	19
2.4.3. Cultura de <i>Leptospira</i>	19
2.5. Prevenção e controle	20
3. OBJETIVO GERAL	22
4. MATERIAIS E MÉTODO	23
4.1. Desenho experimental e critérios de inclusão	23
4.2 Coleta e acondicionamento de amostras	24
4.3 Soroaglutinação Microscópica	24
4.4 Cultura de leptospiros	25
4.5 Extração de DNA e PCR	26
5. RESULTADOS	27
6. DISCUSSÃO	30

7. CONCLUSÃO	34
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
APÊNDICE A.....	39

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose bacteriana reemergente, que afeta uma gama de mamíferos, incluindo cães e humanos, podendo causar desde doença com sintomatologia clínica aguda e letal, até infecções assintomáticas (SCHULLER et al., 2015). Na leptospirose canina, a transmissão é direta e ocorre pelo contato com urina contaminada, frequentemente pelo comportamento predatório de animais infectados e ocorre também pelo contato com material biológico contaminado (SKYES et al., 2010). A transmissão indireta também é possível, mais comumente em situações em que indivíduos susceptíveis infectam-se por conta de leptospirosas patogênicas presentes no ambiente (SKYES et al., 2010). Fora a potencial transmissão direta ou indireta, a doença conta com o fator de cães atuarem como sentinelas, indicando que o patógeno está circulando em determinado local e provavelmente entrando em contato com outros mamíferos, levantando a pressuposição de que a imunoprofilaxia é a forma preventiva recomendada, a fim de evitar surtos epidêmicos da doença.

A leptospirose canina tem sido amplamente documentada (AZOCAR-AEDO & MONTI, 2016). E cães podem apresentar tanto a forma aguda da doença, quando há eliminação do patógeno em grandes quantidades, via urina e fluidos corporais, bem como a forma assintomática, na qual cães infectados eliminam o patógeno de forma assintomática, pela urina, por grandes períodos (SCHULLER et al., 2015). A existência das duas condições da doença, configuram indivíduos da espécie canina como uma importante fonte de infecção, resultando em necessidades de estratégias de controle, prevenção e manejo de animais que apresentam estas condições, já que a leptospirose acomete populações humanas e não-humanas (ANDRE-FONTAINE, 2006). Estudos recentes indicam reemergência clínica em humanos e cães (HARTSKEERL et al., 2011; DELAUDE et al., 2017) levando em consideração a relevância de aprimorar as abordagens atuais de diagnóstico e prevenção.

É necessário penetração pela via cutânea para atingir a corrente sanguínea, e assim as leptospirosas se multiplicam rapidamente, de forma sistêmica no organismo do hospedeiro, atingindo alguns órgãos e tecidos como os rins, fígado, baço, sistema nervoso central, olhos e trato genital. (ADLER & LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010) Hospedeiros caninos que não conseguem debelar a infecção durante a fase aguda da doença, apresentam sinais clínicos mais severos e prognóstico desfavorável. Os

sintomas mais comuns são resultantes de quadros de insuficiência renal e hepática, podendo cursar com quadros de uveíte, hemorragia pulmonar, febre, aborto, anorexia, mialgia, choque hipovolêmico, edema periférico, vômitos, diarreia, sangramento e dor lombar ou abdominal (SKYES et al., 2010). As alterações laboratoriais mais frequentemente observadas em casos de leptospirose aguda, são trombocitopenia, leucocitose com desvio à esquerda, altos níveis de ureia e creatinina séricas (VAN DE MAELE et al., 2008), valores elevados de enzimas hepáticas e bilirrubina total, hipoalbuminemia, isostenúria, hematúria e glicosúria (SKYES et al., 2010).

Apesar de todos os sintomas e achados laboratoriais indicarem uma possível infecção aguda, o diagnóstico definitivo tem como base nos resultados de técnicas confirmatórias específicas para a identificação direta ou indireta do patógeno (CERQUEIRA & PICARDEAU, 2009) como a microscopia de campo escuro, cultivo bacteriano, a reação em cadeia da polimerase (PCR) e titulação de anticorpos séricos.

A técnica que avalia a presença de anticorpos antileptospiras no soro sanguíneo do paciente, conhecida como soroaglutinação microscópica (MAT) tem sido extensivamente utilizada para diagnóstico sorológico da enfermidade aguda em cães (PINTO et al., 2017). Contudo, não é possível identificar o provável sorovar infectante e diferenciar títulos vacinais de títulos de exposição, limitando o seu uso para diagnóstico da infecção (CHIRATHAWORN et al., 2014). Além disso, as amostras precisam ser analisadas de forma pareada para identificar a soroconversão com base no aumento de quatro vezes em relação a primeira amostra, utilizar uma única amostra durante a fase aguda pode resultar em falso negativo. Porém, muitas vezes a coleta adicional de amostras não é possível, devido a alta letalidade da enfermidade.

Em contrapartida, a técnica de PCR, tem sido amplamente utilizada para confirmar a infecção em sua fase aguda. (FINK et al., 2015; HARKIN et al., 2003) A PCR, por mais que seja a técnica recomendada para detecção da doença na fase de leptospiremia, não traz resultados satisfatórios quanto ao diagnóstico da fase convalescente da leptospirose (MIOTTO et al., 2018), demonstrando restrições também ao ser utilizada como única técnica diagnóstica. Como o exato momento de fase aguda da doença em relação aos sintomas clínicos não é detectável, e todos os testes diagnósticos utilizados tem suas limitações quanto a sensibilidade e especificidade, fica claro que a abordagem múltipla de testes diagnósticos para

leptospirose, em conjunto com sinais clínicos e laboratoriais, pode aumentar as chances de diagnóstico conclusivo e tratamento do paciente acometido (FRAUNE et al., 2013). Mesmo perante do favorecimento de diagnóstico definitivo ao associar diferentes técnicas diagnósticas, o único modo para identificar o sorogrupo ou sorovar da estirpe infectante é o isolamento do agente (SCHULLER et al., 2015). Entretanto, a técnica de isolamento conta com limitações em relação ao crescimento da bactéria e contaminação dos meios de cultura utilizados (SCHULLER et al., 2015). Além da notável restrição pela instituição de antibioticoterapia aos primeiros sinais da doença (FRAUNE, et al. 2013), impedindo o crescimento bacteriano pela técnica de isolamento.

Desse modo, ao considerar as limitações de cada teste em relação as fases da leptospirose, bem como o seu benefício ao associar as técnicas diagnósticas, a presente proposta pretendeu caracterizar cães com leptospirose aguda atendidos no serviço ambulatorial do Hospital Veterinário da Universidade Santo Amaro (Hovet UNISA), utilizando múltiplas técnicas diagnósticas, em conjunto com a suspeita clínica e laboratorial, testes sorológicos, moleculares e microbiológicos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Etiologia e classificação

A leptospirose, é uma doença zoonótica de importância mundial acometendo inúmeras espécies de animais, são bactérias espiraladas, pertencentes à família Leptospiraceae, gênero *Leptospira*. São finas, flexíveis e filamentosas (HAGIWARA et al., 2015), medindo aproximadamente 0,1 a 0,2 μm de largura por 6 a 12 μm de comprimento, formando espirais finas e extremidades em formato de gancho (GREENE, 2015).

São coradas de forma positiva pela coloração de Gram e apresentam motilidade (HAGIWARA et al, 2015). A membrana externa da bactéria é composta por lipossacarídeos, conhecidos como LPS, sendo a principal LipL32, com um papel fundamental na patogenia da infecção, associada a propriedades de bactérias gram-negativas, a composição de cada lipopolissacarídeo depende do tipo de sorovar (HAGIWARA et al., 2015).

Sua classificação é complexa, uma vez que, inicialmente eram divididas de acordo com seu isolamento em cultura e reatividade imunológica (GREENE, 2015). De forma clássica, o gênero é separado em duas espécies: *L. interrogans sensu lato* contendo todas as estirpes patogênicas e descrita em mais de 250 sorovares e a *L. biflexa sensu lato*, apresentando todas as estirpes saprofíticas que existem no meio ambiente (GREENE, 2015). Sorovares estão incluídos em sorogrupos, porém, podem apresentar diferenças na patogenicidade, composição genética e conformação em relação ao hospedeiro de manutenção (HAGIWARA et al., 2015)

O surgimento das técnicas moleculares permitiu a classificação das bactérias com base na sua relação genética, identificando inúmeras espécies de *Leptospira* (BHARTI et al., 2003). Até este ponto, são incluídas 20 espécies classificadas molecularmente em cepas intermediárias, saprófitas e patogênicas (SCHULLER et al. 2015). O grupo de cepas patogênicas incluem: *L.borgpetersenii*, *L.inadai*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*, *L. weilliie*, *L. santarosai*, *L. wolbachii*, *L. interrogans*, *L. alexanderi*, *L. kmetyi* (LEVETT, 2001).

2.2. Epidemiologia

Sua distribuição é mundial, cães soropositivos foram identificados em muitos países e variam de acordo com a sua região (WHITE et al., 2017). Anticorpos contra *L. autumnalis*, *L. bratislava*, *L. canicola*, *L. grippotyphosa*, *L. harjo*, *L. icterohaemorrhagiae* e *L. pomona*, são os mais encontrados nos Estados Unidos (NELSON; COUTO, 2023). e recentemente, no Brasil foi identificada a *L. santarosai* do sorogrupo Sejroe em cães hígidos (MIOTTO et al., 2018).

As leptospirosas patogênicas vivem nos rins dos hospedeiros de manutenção, não apresentando sintomatologia clínica, ou quando presentes, são gerais e imperceptíveis. Ao ser infectado o hospedeiro elimina a bactéria via urina por períodos grandes, ou até por toda vida. O homem é o hospedeiro acidental, podendo apresentar sintomas agudos e fatais ou crônicos e amenos. No Brasil, os casos de leptospiroses caninas e humanas, estão relacionadas a aglomeração em grandes cidades e falta de saneamento básico, propiciando a aparição de ratos e comundongos em regiões habitadas por animais domésticos e humanos. (HAGIWARA et al., 2015).

A casuística é maior no verão e outono, sua incidência começa a aumentar de acordo com anos em que o índice pluviométrico for maior. A infecção por espécies adaptadas a determinado mamífero hospedeiro costuma ser subclínica, enquanto, o cenário contrário, quando há infecção por espécies não adaptadas, acontece a doença com manifestações clínicas. De forma geral, pacientes caninos que recebem tratamento a tempo ou que desenvolvem resistência e resposta imune a doença, sobrevivem (NELSON; COUTO, 2023). Como exemplo, o cão é considerado o hospedeiro de manutenção do sorovar Canicola, e pode transmitir para outro indivíduo susceptível ou pode se manifestar no próprio hospedeiro, cursando com a sintomatologia clássica de leptospirose aguda, que é o comprometimento renal agudo (HAGIWARA et al., 2015).

Segundo o Serviço de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde (2014), é um problema de saúde pública no Brasil, e entre outros países tropicais em desenvolvimento, tendo uma grande importância social e econômica decorrente da alta incidência e significativo número de internações em conjunto com a sua letalidade. Os principais padrões epidemiológicos da leptospirose no Brasil, são relacionados com a distribuição endêmica, epidemias urbanas principalmente em comunidades

carentes, pós enchentes e inundações, correlacionados com grandes desastres naturais e surtos em áreas rurais. A incidência tem uma média anual de 1,9 a cada 100.000 habitantes.

2.3. Patogênese e sinais clínicos

A entrada da bactéria ocorre por meio de mucosas ao penetrar na circulação sanguínea se dissemina pelos órgãos alvo da doença, principalmente o fígado, baço e rins (GREENE, 2015), a duração da leptospiremia é cerca de sete dias, nesse momento há multiplicação das *leptospiras* na circulação sanguínea (ADLER & LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). A infecção pode se desenvolver em cães de qualquer idade, raça e sexo que não forem imunes previamente. Os principais sintomas clínicos envolvem anorexia, depressão, hiperestesia muscular generalizada, febre, mucosas hipocoradas, taquipneia, taquicardia poliúria, polidipsia e icterícia. Devido a trombocitopenia e à coagulação intravascular disseminada, sinais como petéquias, hematêmese, melena e epistaxe, são comuns. (NELSON; COUTO, 2023)

Os sinais clínicos são influenciados pelo sorovar infectante (GOLDSTEIN et al., 2006). A leptospirose é bastante conhecida pelas suas lesões hepáticas e renais, cursando com sintomas como icterícia e desenvolvimento de nefrite aguda (GREENE, 2015).

A Síndrome Pulmonar Hemorrágica associada à Leptospirose (LPHS), é descrita em seres humanos, mas também acomete cães, devendo ser considerado como diagnóstico diferencial em cães com dispneia (KLOPFLEISCH et al., 2010). O pulmão é atingido devido a quantidade de toxinas bacterianas (GREENE, 2015)

As estirpes infectantes de leptospiras, podem afetar outros órgãos, como o pâncreas, órgãos reprodutores, úvea, retina e o baço, levando a quadros de esplenomegalia (SCHULLER et al., 2015).

2.4. Diagnóstico

A leptospirose canina apresenta achados clínico laboratoriais que dependem do estágio e sorovar da doença. Na hematologia; trombocitose e trombocitopenia,

leucopenia esperada na fase aguda, evoluindo para leucocitose com desvio à esquerda. Convenientemente as plaquetas são observadas em relação ao grau de hipóxia; angústia respiratória do paciente (GREENE, 2015), a anemia pode estar presente, decorrente da hemólise que a doença causa (COSTA et al., 2013).

Há notável azotemia, aumento dos níveis de creatinina e ureia no soro sanguíneo, indicando comprometimento renal (LEVET, 2001). A fase de leptospiremia tem valores de uréia sérica variando de 100mg/dL a 400 mg/dL em casos de doença grave, ao passo que os valores de creatinina sérica oscilam entre 5mg/dL e 10mg/dL (PAES, 2016). As enzimas hepáticas podem apresentar valores altos de fosfatase alcalina e bilirrubina, explicando sinais indicativos de icterícia e colestase (FREIRE et al., 2008).

O diagnóstico precoce favorece o sucesso terapêutico e traz menos chances de inserção de sorovares no ambiente, bem como sua contaminação, visto que é uma doença zoonótica e cães atuam como sentinelas (REAGAN; SKYES, 2019). Então para o diagnóstico confirmatório de leptospirose canina, faz se necessário a utilização de testes específicos (LEVETT, 2001).

O diagnóstico de leptospirose conta com a disponibilidade de testes diretos, procurando o antígeno na amostra, e testes indiretos, com base na pesquisa de anticorpos antileptospiras no animal. Em meio aos testes diretos, a Microscopia de Campo Escuro permite a visualização direta das bactérias em amostras de urina, porém trata-se de um teste com baixa especificidade e sensibilidade, demandando a utilização de um equipamento de alto valor, e em grande maioria das vezes disponível somente para centros de pesquisas. Em contrapartida, a PCR, vem sendo muito usada para diagnóstico direto em animais com suspeita, amplificando os genes da bactéria. O teste indireto amplamente emprego, sendo considerado de escolha para a confirmação da infecção, é o de Soroaglutinação Microscópica (MAT), na qual avalia-se a formação de aglutinação, reagente do antígeno com anticorpo, via amostra de soro do paciente.

2.4.1. Soroaglutinação Microscópica (MAT)

A MAT é o teste de mais comumente utilizado e recomendado pela Organização Mundial da Saúde visando o diagnóstico de leptospirose (HAGIWARA, et al., 2015).

A MAT é o teste recomendado pela Organização Mundial da Saúde para diagnóstico de leptospirose (HAGIWARA et al., 2015). E deve ser feito com amostra de soro do paciente. Ao ser testado em diluições seriadas, devem ser considerados reagentes aqueles que apresentarem 50% de aglutinação no microscópio de campo escuro (LEVET, 2001). Devido à grande variedade de sorovares, o maior número possível deve ser testado na MAT. *L. bratislava*, *L. canicola*, *L. grippothyphosa*, *L. hardjo*, *L. pomona* e *L. icterohaemorrhagiae* são as mais utilizadas (NELSON; COUTO, 2023).

É um teste de confirmação após soroconversão, portanto, na fase hiperagudas da doença pode apresentar falso negativo. Faz se necessário reavaliações com intervalo de 7 a 14 dias. O diagnóstico é definido caso a segunda amostra coletada, tenha aumento de 4 vezes em relação a primeira que foi testada (REAGAN; SKYES, 2019). Regiões consideradas endêmicas, um único teste com títulos ≥ 800 já é confirmação de infecção ativa (LEVETT, 2001).

Apesar de ser amplamente utilizado, a MAT possui limitações como a necessidade um profissional treinado para realizar a leitura do teste. Reações cruzadas entre sorogrupos podem dificultar a interpretação do teste, bem como reações inespecíficas (HAGIWARA et al., 2015). Animais vacinados apresentam títulos variáveis para sorogrupos presentes e não presentes na vacina (REAGAN; SYKES, 2019), não sendo possível distinguir títulos vacinais dos títulos da infecção (LEVETT, 2001).

O sorovar encontrado com o título mais alto, nem sempre é o infeccioso, portanto, somente a cultura bacteriana para isolamento permite caracterizar o sorovar infectante (LEVET, 2001), informação primordial para criação de vacinas contra sorovares específicos em cada região.

2.4.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR pode detectar a bactéria na urina, sangue ou tecidos (HARKIN et al., 2003), tendo como vantagem a detecção em diferentes tipos de amostra, mostrando-se útil para diagnóstico de infecções aguda, quando ainda não houve soroconversão, podendo diferenciar portadores convalescentes e assintomáticos (HAGIWARA et al., 2015). A PCR não permite a identificação de sorovar, somente responde com a identificação da espécie da bactéria infectante (PICARDEAU, 2013; REAGAN; SYKES, 2019)

A amostra de sangue é recomendada para detecção em animais no início da infecção, a urina após a primeira semana para detecção da fase leptospirúrica (REAGAN; SYKES, 2019), em casos que o histórico do paciente seja desconhecido, a utilização de ambas amostras torna o teste mais sensível, porém, caso a carga bacteriana estiver baixa ou o tratamento já tiver sido instituído, as chances de falso-negativos são altas (REAGAN; SYKES, 2019).

Os primers são notoriamente utilizados, com o intuito de amplificar 331pb do gene 16s. No entanto, o mesmo gene, está presente em leptospiros saprófitas e patogênicas (LEVET, 2001). A vacinação recente não deve interferir em detecção molecular (NELSON; COUTO, 2023)

2.4.3. Cultura de *Leptospira*

O processo de isolar leptospiros é difícil devido ao crescimento lento e necessidade meios de culturas específicos, os meios mais utilizados para cultivo de leptospiros é o Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) (REAGAN; SYKES, 2019) e o meio Fletcher. (PHILIP; GARBA; NEELA, 2018).

Somente o isolamento da bactéria permite a identificação do sorovar infectante (REAGAN; SYKES, 2019), e consequentemente a criação de meios preventivos e adicionais na imunoprofilaxia.

Fora a confirmação diagnóstica, os resultados também são incorporados na bateria de antígenos presentes na técnica de MAT (PHILIP; GARBA; NEELA, 2018).

As culturas semeadas devem ser acompanhadas por pelo menos, 6 semanas. Mantidas em estufa entre 28°C a 30°C, devem ser avaliadas semanalmente para observação da zona de *Dinger*. Para observação das bactérias, é necessário pipetar uma gota do meio e adicionar em lâmina para em seguida ser visualizado em microscópio de campo escuro (LEVETT, 2001).

2.5. Prevenção e controle

A Prevenção de leptospirose canina começa na eliminação do estado portador do animal em relação ao sorovar Canicola, no entanto, não é possível controlar animais silvestres e sinantrópicos de estarem constantemente eliminando o patógeno no ambiente, transmitindo e contaminando populações susceptíveis. Ao controlar roedores em canis, realizar adequada higiene do lugar, mantendo os animais infectados em quarentena, são importantes medidas de prevenção do patógeno (HAGIWARA et al., 2015).

As leptospirosas podem ser eliminadas com uso de detergentes, desinfetantes a base de iodóforos e desidratação. O local onde cães possivelmente infectados permanecerem devem ser limpos com hipoclorito e papel toalha. Material proveniente dos pacientes, devem ser considerados como risco biológico (TOSTES, 2010).

As vacinas presentes no mercado são caracterizadas pela composição advinda de culturas de leptospirosas inativadas acrescidas de adjuvantes, tendo em sua composição, os sorovares prevalentes no Brasil (SANTOS et al., 2021)

Para pacientes caninos, as disponíveis são as polivalentes, V8 contendo sorovares: Icterohaemorrhagiae, Canicola, V10 com adição de mais dois sorovares, sendo eles: Grippothyphosa e Pomona, V11 acrescidos com Copenhageni e Wolfii e V12, contendo todas citadas anteriormente, com adição dos sorovares Hardjo e Pyrogenes. (SANTOS et al., 2021)

A vacina é utilizada para imunização contra um sorovar específico, protegendo contra o sorovar icterohaemorrhagiae e canicola, no entanto, mesmo com a vacinação atualizada anualmente, os cães podem ser infectados por outros tipos de sorovares infectantes (GREENE, 2015). Reforçando a necessidade de estudos de vigilância continuada para incluir sorovares infectantes, que realmente circulam na região.

Fora a imunoprofilaxia, é de suma importância a aplicação de outros métodos preventivos, como, por exemplo, evitar contato com águas potencialmente contaminadas (advindas de enchentes), controle da população de roedores, melhora do saneamento básico, promoção de coleta de lixo e conscientização da população sobre a doença (SANTOS et al., 2021). Levando em consideração que somente evitar o contato com roedores, não é o suficiente para total prevenção, visto que todos os mamíferos (fora o homem) são potenciais transmissores e responsáveis pela contaminação ambiental da bactéria.

3. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi atender e diagnosticar cães com suspeita clínica aguda de leptospirose, que foram atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Santo Amaro, utilizando técnicas sorológicas, moleculares e microbiológicas.

4. MATERIAIS E MÉTODO

4.1. Desenho experimental e critérios de inclusão

Amostras de sangue total e urina foram coletadas de cães com suspeita clínica e laboratorial de leptospirose aguda, na tentativa de diagnóstico definitivo da doença.

Foram considerados suspeitos cães que apresentaram azotemia sérica de ureia e creatinina de origem desconhecida (acima de 64,2 mg/dL e 1,4 g/dL, respectivamente) associados à dois ou mais sinais clínicos sugestivos de leptospirose, como: distúrbios hemorrágicos, febre, vômitos, icterícia, hiporexia/anorexia). Cães que se mostraram com poliúria, polidipsia e perda de peso até um mês antes da apresentação no ambulatório não foram incluídos no estudo para descartar possíveis quadros de doença renal crônica.

As amostras de sangue e urina coletados foram coletadas imediatamente após a suspeita da doença, e direcionadas para a cultura e detecção molecular de bactérias por meio da PCR, bem como a utilização para exames hematológicos complementares (hemograma completo diferencial) e urinálise do paciente. Amostras de soro foram destinadas para investigar anticorpos anti-leptospiras por meio da técnica MAT, e avaliadas para mensuração de ureia e creatinina sérica, atividade das enzimas hepáticas (fosfatase alcalina e alanina aminotransferase) e concentração de bilirrubinas direta e indireta. Após início da terapia medicamentosa, os cães foram acompanhados prospectivamente, e os retornos incluíram coleta de urina e sangue para realização da PCR, urinálise e hemograma.

Amostras de soro foram utilizadas para reavaliação da bioquímica sérica e titulações de anticorpos anti-leptospiras. As amostras obtidas nas avaliações posteriores foram coletadas uma vez ao dia, durante o período de acompanhamento clínico dos pacientes pela equipe do Hovet, até a conclusão do caso. A inclusão do paciente no estudo só foi possível mediante a aplicação de questionário, e a coleta e manejo do animal, foi realizada somente após o termo de consentimento livre e esclarecido assinado (APÊNDICE A). O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa SOB REGISTRO CAEE X.

4.2 Coleta e acondicionamento de amostras

As amostras de urina foram coletadas por micção espontânea, sondagem uretral ou cistocentese, e quando destinadas a isolamento e cultura, coletadas por cistocentes para diminuir o risco de contaminação bacteriana. As coletas de sangue foram realizadas mediante a punção venosa da veia cefálica ou jugular, em seguida armazenadas em tubo com EDTA, direcionadas para identificação de material genética de leptospiros patogênicas. Uma fração do sangue total foi armazenada em tubo sem anticoagulante, para após a centrifugação, obtenção do soro sanguíneo com objetivo de realização dos devidos exames anteriormente mencionados. Todas as amostras foram mantidas sob refrigeração e processadas em até 24h após a coleta. As amostras de urina destinadas a cultivo bacteriano e ao isolamento de leptospiros foram semeadas em meios específicos logo após a coleta. As amostras de urina direcionadas para PCR foram acrescidas de EDTA com concentração final de 10nM e incubadas por 1 hora. Centrifugadas a 12.000xg por 15 minutos a 20°C para sedimentação, sendo por fim, ressuspendidas em 3 mL de PBS estéril após o descarte do sobrenadante.

4.3 Soroaglutinação Microscópica

A realização da MAT, foi utilizada com base no painel de 24 sorovares representando 20 sorogrupos, os títulos de corte foram determinados usando duplas diluições até que o último poço demonstrasse 50% de aglutinação. Para confirmação de leptospirose aguda, foi adotado o critério de: uma reação positiva é definida com títulos de anticorpos maior ou iguais a 100, porém, apenas os cães que não tinham histórico vacinal e títulos iguais ou maiores que 800, foram considerados com infecção aguda.

No que se refere a avaliação prospectiva, ao parear duas amostras de dois momentos diferentes de coletas, foram consideradas positivas e com leptospirose aguda, aqueles pacientes que obtiveram 4 vezes o título da primeira amostra.

Quadro 1: Variantes sorológicas utilizadas na MAT. Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Universidade de São Paulo (VPS-USP), 2024.

Código	Sorogrupo	Variante Sorológica	Código	Sorogrupo	Variante Sorológica
1-A	Australis	Australis	10-B	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae
1-B	Australis	Bratislava	11	Javanica	Javanica
2	Sejroe	Guaricura	12	Panama	Panama
2-A	Autumnalis	Autumnalis	13-A	Pomona	Pomona
2-B	Autumnalis	Butembo	14	Pyrogenes	Pyrogenes
3	Ballum	Castellonis	15-A	Sejroe	Hardjo (Hardjopratiño)
4	Batavia	Bataviae	15-C	Sejroe	Hardjo (Hardjobovis)
5	Canicola	Canicola	16	Shermani	Shermani
6	Celledoni	Whitcombi	17	Tarassovi	Tarassovi
7	Cynopteri	Cynopteri	36	Pomona	Pomona
8	Gryppotyphosa	Gryppotyphosa	ST	Djasiman	Sentot
9	Hebdomadis	Hebdomadis	20	Saramanga	Patoc
10-A	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni			

4.4 Cultura de leptospiiras

O isolamento de leptospiiras contou com protocolo que constituiu em: semear 500µL de urina total direta nos meios de cultura, e 500µL diluídos em solução salina estéril nas concentrações de 1:10 e 1:100, e em seguida semeadas em meio de cultura utilizando 500µL. Para as amostras de sangue, foram diluídos 500µL em solução salina estéril nas concentrações 1:10, 1:100 e 1:1000. Foram empregados o meio EMJH acrescido e não acrescido com 5-fluorouracil na concentração final de 100 µg/mL. Os tubos foram incubados e mantidos a 28°C e observados por cerca de seis semanas, para a verificação da zona de *Dinger* de leptospiiras no meio. A confirmação das bactérias foi realizada pela visualização de espiroquetas em uma gota de amostra em microscópio de campo escuro com aumento de 200 vezes (MYERS, 1985) utilizando o meio de cultura EMJH.

4.5 Extração de DNA e PCR

O DNA foi extraído utilizando 200µL de sangue e urina centrifugada e ressuspensa em EDTA, por meio do kit *PureLink® Genomic DNA Mini Kit* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Carlsbad, CA, EUA) seguindo as recomendações do fabricante. O DNA extraído foi armazenado a -20°C até a data da análise. A amplificação de DNA de leptospiros patogênicos para determinação das sequências relevantes foi realizada por meio do método que amplificou um fragmento de 331bp do gene 16S, realizado pela utilização de primers e condições de amplificações assim como descritas por Merien et al, (1992).

Cada reação teve ao final 25µ, utilizando 2,5µL do DNA total, 1,25µL de cada primer, 7,5µL de *DNase free* 25µL, utilizando 2,5µL do DNA total, 1,25µL de cada primer, 7,5µL de *DNase free* e 12,5µL *GoTaq Green Master Mix 1X* (Promega Corporation, Madison, WI, USA) para reação com volume de concentração final 25µL, seguindo o manual do fabricante. Foi utilizado como controle positivo DNA extraído de cultura pura de leptospiros e como controle negativo *DNase free* em cada uma das reações.

As amostras ampliadas foram separadas por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com SYBR Safe DNA (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Carlsbad, CA, EUA), e analisados sob transiluminação ultravioleta. Para confirmar os resultados de PCR, todas as amostras positivas foram submetidas a uma amplificação parcial do gene 16S rRNA, que tem como alvo um fragmento de 331 pb.

5. RESULTADOS

Foram atendidos 24 cães com suspeita de leptospirose canina aguda, entre janeiro e outubro de 2024. Os resultados dos exames realizados nesses animais podem ser visualizados na Tabela 1.

Dos 24 cães, 11 (45,8%) foram reagentes na reação de MAT, com títulos variando entre 100 e 14.200. A frequência de sorovares reagentes foi: Icterohaemorrhagiae (7), Copenhageni (6), Shermani (5), Castellonis (3), Cynopteri (2), Pyrogenes (2), Canicola (1), Pomona (1), Hardjo (1), Bratislava (1), Autumnalis (1), Gryppotyphosa (1), Tarassovi (1).

Dentro os 24 animais, 6 (25%) foram considerados ativamente infectados, com titulações iguais ou maiores que 800, os prováveis sorogrupos infectantes foram: Icterohaemorrhagiae (5), logo em seguida Shermani (3), e Ballum (1), Autumnalis (1), Canicola (1), Pomona (1), Australis (1). Sendo que o sorogrupo que apresentou a titulação mais elevada, foi o Pomona com resultado de 14.200. Nenhum animal tem histórico de vacinação.

A amplificação do gene 16S foi bem-sucedida em 8 animais (33,3%), sendo que 3 deles foram positivos somente para amostras de sangue; 4 somente em amostras de urina, e 1 positivo à PCR em ambas as amostras. Foi possível avaliação prospectiva em 9 animais (2, 3, 4, 5, 9, 16, 17, 18, 23), e somente o animal 16 teve um resultado positivo para PCR na segunda amostra. O restante, obtiveram PCR e MAT negativo.

A comparação entre resultados demonstrou que 4 (16,6%) foram diagnosticados exclusivamente pela MAT, e 7 (29,1%) somente pela PCR, 1 (4,1%) foi positivo para ambos os testes e 1 (4,1%) confirmado pelos testes de MAT, PCR e cultura bacteriana. Apenas 1 (4,1%) foi diagnosticado exclusivamente pelo crescimento microbiológico. No total, portanto, 14 (58,3%) dos 24 animais foram efetivamente diagnosticados como casos de leptospirose aguda, demonstrando que pelo menos 11 animais teriam resultados falso-negativo, caso realizado apenas um dos testes utilizados.

Os animais 2, 4, 7, 8, 9, 11 e 23 tiveram resultados negativos em todos os três testes realizados, sendo que alguns foram retestados na segunda consulta clínica

(animais 2, 4, 9, 23). Dos 24 animais, 14 (58,3%) deles vieram a óbito durante o andamento do projeto, e 5 (20,8) sobreviveram.

No total foram obtidos dois isolados de leptospiros, que estão sendo atualmente tipificados por técnicas moleculares para determinação da espécie genômica (Sequenciamento de fragmento do gene 16S e Multilocus Sequence Typing), e por técnica de sorogrupagem para determinação do sorogrupo infectante.

Tabela 2: Resultados de Soroaglutinação Microscópica, PCR, e cultivo bacteriano de 24 cães atendidos no HOVET com suspeita clínica de leptospirose aguda entre janeiro e outubro de 2024.

Cão	Cultivo	PCR			MAT													
		SG	UT	NC	Sorogrupos													
					≥100	CAS	CO	SHE	CAN	PO	IC	PY	CYN	HA	BRA	GRY	TAR	AUT
1	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	400	(-)	800
2*	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
3*	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	200	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
4*	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
5*	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	100	(-)	(-)	200	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
6	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	6.400	6.400	1600	6.400	14.200	800	200	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
7	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
8	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
9*	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
10	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	200	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
11	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
12	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	12800	3200	(-)	(-)	12800	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
13	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	800	1600	(-)	(-)	1600	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
14	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	400	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
15	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
16*	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
17*	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
18*	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
19	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	800	100	(-)	(-)	200	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
20	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
21	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	100	400	(-)	(-)	(-)	6.400	100	200	(-)	6.400	(-)	200	(-)
22	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	200	200	(-)	(-)	(-)	(-)
23*	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
24	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

*: Animais com avaliação prospectiva.

SG: sangue total; UT: Urina Total; NC: amostras de necropsia. Sorogrupos: Cas: Castellonis; Co: Copenhageni; SHE: Shermani; Can: Canicola; PO: Pomona; IC: Icterohaemorrhagiae; PY: Pyrogenes, CYN: Cynopteri, HA: Hardjo, BRA: Bratislava, TAR: Tarassovi, AUT: Autumnalis.

6. DISCUSSÃO

A abordagem de múltiplos testes laboratoriais permitiu o diagnóstico de 58,3% dos cães incluídos no estudo, sendo esse um resultado superior comparado com a utilização de uma só técnica. Esses resultados se assemelham com os descritos anteriormente por Miotto *et al.*, (2018), que encontrou resultados positivos em 54,5% cães com associação de MAT e PCR, bem como os resultados descritos por Rodrigues *et al.*, (2007) que demonstrou que ao parear testes as chances de confirmação de leptospirose canina aumentam.

O diagnóstico exclusivo pela MAT foi possível em 4 animais, e pela PCR em 7 dos pacientes, levando em consideração que a utilização da PCR confirma a infecção antes da soroconversão, e a técnica MAT numa fase mais tardia da doença (LEVETT, 2001). A PCR foi capaz de amplificar DNA leptosírico em 3 amostras de sangue (leptospiemia), 4 amostras de urina (leptospiúria) e em um animal ambas as amostras foram amplificadas, com resultados semelhantes anteriormente descritos por Santos *et al.*, 2019, que obteve resultados positivos para PCR em cinco animais, e outros cinco animais foram diagnosticados pela MAT, porém, com um resultado maior comparado a este presente estudo, em que, seis animais, foram positivos para ambos os testes. O animal que teve PCR positivo tanto para sangue quanto urina, provavelmente está transicionando entre a fase aguda para crônica da doença (TOSTES, 2010). A análise prospectiva demonstrou que somente uma animal teve um resultado positivo para PCR na segunda consulta clínica, apesar de ter a primeira amostra negativa.

Nenhum animal neste presente estudo apresentou sinais de soroconversão à segunda coleta, no entanto, a leptospirose apresenta um período de incubação de 2 a 14 dias, sendo que na primeira semana da doença, os títulos podem se apresentar baixos ou negativos (SKYES *et al.*, 2023). Os animais que tiveram avaliação prospectiva não apresentavam uma consistência no intervalo de tempo entre a primeira e segunda coleta, em média, 3 dias após a primeira coleta, a segunda já era realizada, o que pode contribuir para a dificuldade em obter títulos significativos, onde a soroconversão ainda não tenha acontecido.

Em duas amostras foi possível o crescimento bacteriano, sendo que em uma delas (animal 19), demonstrou PCR para sangue positivo e título igual a 800 para o

sorogrupo *Icterohaemorrhagiae*, sugerindo que ao associar técnicas diagnósticas, a confirmação é mais precisa, bem como, a possibilidade de identificar a fase em que a doença se encontra. A amostra que teve somente a cultura positiva (animal 20), indica que utilizar somente a MAT, mesmo com todas suas recomendações, sozinha, não se demonstra totalmente eficiente para diagnóstico confirmatório de leptospirose aguda (HARKIN et al., 2003).

Os sorogrupos de maior importância epidemiológica relatados no Brasil, são *Canicola* e *Icterohaemorrhagiae*, pertencentes ao grupo de leptospiros patogênicas, no entanto, em outros estudos também foram encontrados sorovares como *Grippotyphosa*, *Australis*, *Butembro* e *Atumnalis*, variando de acordo com a região (ARAÚJO, 2023; ESTEVES et al., 2021). Neste presente estudo as aparições de prováveis sorogrupos infectantes foram principalmente: *Icterohaemorrhagiae* (5), logo em seguida *Shermani* (3), e *Ballum* (1), *Autumnalis* (1), *Canicola* (1), *Pomona* (1), *Australis* (1). Os sorovares *Canicola*, *Icterohaemorrhagiae* e *Copenhageni* são frequentemente associados a doenças em cães, sendo que os dois primeiros citados estão presentes nas vacinas comerciais (PINTO; FORD et al., 2017). Levando em consideração que os sorovares *Icterohaemorrhagiae* e *Copenhageni*, estão inclusos no sorogrupo *Icterohaemorrhagiae*, o provável sorogrupo que teve maiores resultados no presente estudo. E o sorovar *Canicola* também inserido no sorogrupo *Canicola*, teve títulos positivos nos pacientes incluídos, condiz com a literatura que acusa os três sorovares de serem os principais causadores de doença em populações caninas e os prováveis sorogrupos infectantes obtidos neste projeto (ESTEVES et al., 2021).

Relatos de demais estudos conduzidos; segundo Santin et al. (2006), o sorovar prevalente encontrado foi *Copenhageni*, em 45% dos cães com suspeita clínica. Os animais reagentes para este provável sorogrupo (*Icterohaemorrhagiae*) infectante (6, 12, 13, 19 e 21) apresentaram títulos maiores que 100, levando em consideração que o sorovar *Copenhageni* não está incluso na vacina V8 e V10, pode-se concluir que mesmo com a imunização, a exposição de animais susceptíveis acontece no meio ambiente. Já Miotto et al. (2018) e Santos et al. (2019) que encontraram sororreatividade para *Icterohaemorrhagiae* e *Copenhageni*, respectivamente, correlacionando com os resultados do presente estudo.

Mesmo com nenhum animal do estudo ter histórico de vacinação, alguns animais obtiveram títulos altos para sorogrupos, que não estão inclusos em vacinas

comerciais. Três cães apresentaram sororreatividade contra o provável sorogrupo Shermani, com títulos variando de 1.600 a 3.200. No entanto, o sorovar Shermani nunca foi isolado no Brasil (SARMENTO et al., 2012), podendo ser considerado como uma reação paradoxal, levando a títulos elevados de sorovares diferentes dos infectantes (SARMENTO et al., 2012), ou mesmo se tratar de um caso de infecção aguda por representantes deste sorogrupo.

O teste padrão ouro recomendado pela Organização Mundial da Saúde continua sendo a soroaglutinação microscópica, no entanto, é uma técnica utilizada depois da soroconversão, ou seja, quando anticorpos antileptospiras já estão detectáveis. O período de incubação da doença é de 2 a 14 dias, na primeira semana, não é possível ter títulos fidedignos para confirmação da doença (SKYES et al., 2023). Alguns outros fatores contribuem para a técnica não conseguir diagnosticar sozinha a leptospirose, como: a utilização de antimicrobianos como tratamento ao primeiro sinal da doença, quantidade limitada de sorovares que são testados na técnica, e títulos pós vacinais que podem persistir em conjunto com títulos de cepas presentes no ambiente (SKYES et al., 2023).

O diagnóstico de zoonose, não é possível ser confirmado somente com um positivo ou negativo encontrado na MAT, trazendo a necessidade de associar a outra técnica diagnóstica, como a detecção de DNA, que pode trazer resultados antes da soroconversão, logo no início da infecção, com amostras de sangue ou urina (SKYES, et al., 2023). Ressaltando a importância da continuidade de estudos relacionados a técnicas diagnósticas de leptospirose canina, visto que, testes padrão-ouro não significam que são os melhores para diagnóstico.

Os resultados encontrados direcionam para hipótese de que os sorovares circulantes no Brasil não sejam somente aqueles encontrados em vacinas comerciais. Ainda sim essa hipótese não pôde ser confirmada somente com os dados apresentados nesse relatório, uma vez que ainda faltam ser realizadas as etapas de identificação dos isolados obtidos. Dessa forma, a investigação e vigilância epidemiológica contínua da leptospirose canina aguda pode contribuir para a eventual inclusão de novas cepas circulantes no território, sendo até o momento a principal estratégia para determinar quais leptospiras de fato infectam cães no país. Somente o isolamento possibilita a caracterização de estirpes infectantes de leptospirose,

informação indispensável para compreensão do cão na cadeia epidemiológica da doença.

7. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo indicam que a combinação de múltiplos testes laboratoriais foi benéfica para o diagnóstico definitivo da leptospirose canina, considerando as limitações específicas de cada método. A técnica de PCR mostrou-se essencial para o diagnóstico precoce da infecção, enquanto o teste de MAT desempenhou um papel relevante na identificação de animais em estágios tardios e convalescentes da doença. Além disso, a caracterização das leptospiros isoladas, juntamente com os resultados do MAT quanto aos prováveis sorogrupos infectantes, contribuirá para uma melhor compreensão das leptospiros que efetivamente circulam nas populações caninas do Brasil. Esses dados, somados ao conhecimento já disponível na literatura científica, poderão embasar o desenvolvimento de vacinas mais adequadas à realidade epidemiológica local, tornando o controle da infecção em cães mais eficaz, reduzindo a contaminação ambiental e minimizando o risco de transmissão zoonótica do patógeno.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, B. & LA PEÑA MOCTEZUMA, de, A., 2010. Leptospira and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, 140(3-4), pp.287–296.
- ANDRE-FONTAINE, G., 2006. Canine leptospirosis—Do we have a problem? **Veterinary Microbiology**, 117(1), pp.19–24.
- AZOCAR-AEDO L. & MONTI, G., 2016. Meta-Analyses of Factors Associated with Leptospirosis in Domestic Dogs. **Zoonoses and Public Health**, 63(4), pp.328–336.
- BHARTI, A. R. et al. Leptospirosis: A zoonotic disease of global importance. **Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 12, p. 757–771, 2003.
- CERQUEIRA, G.M. & PICARDEAU, M., 2009. A century of Leptospira strain typing. *Infection*, **Genetics and Evolution**, 9(5), pp.760–768.
- CHIRATHAWORN, C. et al., 2014. Interpretation of microscopic agglutination test for leptospirosis diagnosis and seroprevalence. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, 4, pp.S162–S164.
- COSTA, F. et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. 0–1, 2015.
- DE, B., & Araújo, Q. (n.d.). **ANÁLISE DOS SOROGRUPOS DE LEPTOSPIRA PRESENTES NO BRASIL-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.**
- DELAUDE A. et al., 2017. Canine leptospirosis in Switzerland-A prospective cross-sectional study examining seroprevalence, risk factors and urinary shedding of pathogenic leptospirae. **Preventive Veterinary Medicine**, 141, pp.48–60.
- FINK, J.M. et al., 2015. Evaluation of three 5' exonuclease-based real-time polymerase chain reaction assays for detection of pathogenic Leptospira species in canine urine. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 27(2), pp.159–166.
- FORD, R. B. et al. 2017 AAHA Canine Vaccination Guidelines. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 53, n. 5, p. 243–251, 2017.
- FRAUNE, C.K. et al., 2013. Evaluation of the diagnostic value of serologic microagglutination testing and a polymerase chain reaction assay for diagnosis of

acute leptospirosis in dogs in a referral center. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 242(10), pp.1373–1380.

GREENE, Craig E. **Doenças Infecciosas em Cães e Gatos**. Rio de Janeiro: Roca, 2015. E-book. ISBN 978-85-277-2725-9.

GOLDENSTEIN RE, et al. Influence of infecting serogroup on clinical features of leptospirosis in dogs. **J Vet Intern Med** 2006; 20: 489.

HAGIWARA, M. K.; MIOTTO, B. A.; KOGIKA, M. M. Leptospirose. In: JERICO, M. M.; KOGIKA, M. M.; ANDADRE NETO, J. P. DE (Ed.). **Tratado de Medicina Interna de Cães e Gatos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanarabara Koogan, 2015.

HAGIWARA, M. K.; MIOTTO, B. A.; TOZZI, B. F. Revisão sobre leptospirose canina no Brasil. **Revista Clínica Veterinária**, v. 119, p. 86–104, 2015.

HARKIN, K.R., ROSHTO, Y.M & SULLIVAN J.T., 2003. Clinical application of a polymerase chain reaction assay for diagnosis of leptospirosis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 222(9), pp.1224–1229.

HARTSKEERL R.A. et. al., 2011. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. **Clinical Microbiology and Infection**, 17(4), pp.494–501.

KLOPFLEISCH, R. et al. An emerging pulmonary haemorrhagic syndrome in dogs: Similar to the human leptospiral pulmonary haemorrhagic syndrome? **Veterinary Medicine International**, v. 2010, 2010.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **American Society for Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 296–326, 2001.

MERIEN, F. et al. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 9, p. 2219–2224, 1992.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. (2009). **Guia Leptospirose: Diagnóstico e Manejo Clínico/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde**.

MIOTTO, B.A. et al., 2018. Diagnosis of acute canine leptospirosis using multiple laboratory tests and characterization of the isolated strains. pp.1–9.

MIOTTO, B.A. et al., 2016. Molecular and serological characterization of the first *Leptospira santarosai* strain isolated from a dog. **Acta Tropica**, 162, pp.1–4.

NELSON, Richard W.; COUTO, C G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. Rio de Janeiro: GEN Guanabara Koogan, 2023.

PAES A.C. 2016. Leptospirose canina, p.356-377. In: Megid J., Ribeiro M.G. & Paes A.C. (Eds), **Doenças Infecciosas em Animais de Produção e de Companhia**. Roca, São Paulo.

PHILIP, N.; GARBA, B.; NEELA, V. K. Long-term preservation of *Leptospira* spp.: challenges and prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 13, p. 5427–5435, 2018.

PINTO, P.S., et al, 2017. A systematic review of leptospirosis on dogs, pigs, and horses in Latin America. **Tropical Animal Health and Production**, pp.1–8.

REAGAN, K. L.; SYKES, J. E. Diagnosis of Canine Leptospirosis. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 49, n. 4, p. 719–731, 2019.

RODRIGUES, A. M. A. et al. Isolamento de *Leptospira* spp . de cães com diagnóstico clínico de leptospirose em São Paulo (Brasil) Isolation of *Leptospira* spp . from dogs with clinical suspect of leptospirosis in São Paulo (Brazil). **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. Supl 2, p. 705–714, 2007.

RODRIGUES, A.M.A. et al., 2012. Isolation and Characterization of *Leptospira interrogans* Serovar Copenhageni and Serovar Canicola From Dogs with Leptospirosis. **Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, 26(3), pp.791–791.

SARMENTO, A. M. C. et al.. Emprego de estirpes *Leptospira* spp. isoladas no Brasil na microtécnica de soroaglutinação microscópica aplicada ao diagnóstico da leptospirose em rebanhos bovinos de oito estados brasileiros. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 7, p. 601–606, jul. 2012

SANTIN, K. et al. Pesquisa de Aglutininas Anti-*Leptospira* em Cães Clinicamente Sadio e com Suspeita Clínica de Leptospirose. 2006.

SANTOS, A. P. L., & Santos, H. P. (2021). LEPTOSPIROSE CANINA: CONSCIENTIZAÇÃO E IMPORTÂNCIA DA REALIZAÇÃO DE AÇÕES EDUCATIVAS DE PREVENÇÃO EM UMA COMUNIDADE NO MARANHÃO / CANINE LEPTOSPIROSIS: AWARENESS AND IMPORTANCE OF CARRYING OUT

PREVENTIVE EDUCATIONAL ACTIONS IN A COMMUNITY IN MARANHÃO. **Brazilian Journal of Development**, 7(1).

SANTOS, C.M., Dias, G.C.D.R.S., Saldanha, A.V.P., Esteves, S.B., Cortez, A., Guedes, I.B., Heinemann, M.B., Gonçalves, A.P., Miotto, B.A., 2021. Molecular and serological characterization of pathogenic *Leptospira* spp. isolated from symptomatic dogs in a highly endemic area, Brazil. **BMC Vet Res** 17, 1–11.

SCHULLER, S. et al., 2015. European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats. **Journal of Small Animal Practice**, 56(3), pp.159–179.

SKYES, J.E. et al., 2010. 2010 ACVIM Small Animal Consensus Statement on Leptospirosis: Diagnosis, Epidemiology, Treatment, and Prevention. **Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, 25(1), pp.1–13.

TOSTES, S., Oliveira, D. E., & Alegre, P. (2010). **UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL FACULDADE DE VETERINÁRIA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS LEPTOSPIROSE CANINA: DADOS CLÍNICOS, LABORATORIAIS E TERAPÊUTICOS EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS.**

VAN DE MAELE I. et al., 2008. Leptospirosis in dogs: a review with emphasis on clinical aspects. **The Veterinary record**, 163(14), pp.409–413.

WHITE AM, et al. Hotspots of canine leptospirosis in the United States of America. **Vet j.** 2017;222:29-35.

WHO-ILS, 2003. **Human Leptospirosis: Guidance For Diagnosis, Surveillance And Co.**

APÊNDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pesquisadores responsáveis: Gabriele Yumi Ramalho, Bruno Miotto.

Sua colaboração é importante e necessária para o desenvolvimento da pesquisa “Isolamento e identificação de leptospiros patogênicas em cães com suspeita clínica de leptospirose”

- 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;

- 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) do animal, o qual sou responsável 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 2024__

Assinatura do representante legal (proprietário) do sujeito de pesquisa

Assinatura do pesquisador