

**UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA**  
**VETERINÁRIA E BEM-ESTAR ANIMAL**

**Sheila Cristina Scandura**

**PESQUISA DOS SOROVARES DE LEPTOSPIRAS QUE MAIS  
FREQUENTEMENTE INFECTAM E CAUSAM DOENÇA EM CÃES  
COM SUSPEITA CLÍNICA DE LEPTOSPIROSE ATENDIDOS NO  
HOSPITAL VETERINÁRIO DA UNIVERSIDADE METODISTA DE SÃO  
PAULO, NO MUNICÍPIO DE SÃO BERNARDO DO CAMPO**

**São Paulo**

**2018**

**SHEILA CRISTINA SCANDURA**

**PESQUISA DOS SOROVARES DE LEPTOSPIRAS QUE MAIS  
FREQUENTEMENTE INFECTAM E CAUSAM DOENÇA EM CÃES  
COM SUSPEITA CLÍNICA DE LEPTOSPIROSE ATENDIDOS NO  
HOSPITAL VETERINÁRIO DA UNIVERSIDADE METODISTA DE SÃO  
PAULO, NO MUNICÍPIO DE SÃO BERNARDO DO CAMPO**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação *Stricto Sensu* da  
Universidade de Santo Amaro – UNISA, como  
requisito parcial para obtenção do título de  
Mestre em Medicina Veterinária e Bem –  
Estar Animal

Orientador: Prof. Dr. Amane Paldês Gonçalves

**São Paulo**

**2018**

## Ficha catalográfica



**SHEILA CRISTINA SCANDURA**

**PESQUISA DOS SOROVARES DE LEPTOSPIRAS QUE MAIS  
FREQUENTEMENTE INFECTAM E CAUSAM DOENÇA EM CÃES  
COM SUSPEITA CLÍNICA DE LEPTOSPIROSE ATENDIDOS NO  
HOSPITAL VETERINÁRIO DA UNIVERSIDADE METODISTA DE SÃO  
PAULO, NO MUNICÍPIO DE SÃO BERNARDO DO CAMPO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* da Universidade de Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária e Bem – Estar Animal.

Orientador: Prof. Dr. Amane Paldes Gonçalves

São Paulo, 04 de setembro de 2018.

Banca Examinadora

.....

Prof. Dr.....

.....

Prof. Dra.....



*Dedico este trabalho aos meus pais e ao meu irmão, a família a qual pertenço, que sempre estiveram aqui por mim, e nos momentos mais difíceis me apoiaram e me reergueram... Vocês são minha estrutura... Ao meu marido e meus filhos, a família a qual formei.... Vocês são meu futuro, minha evolução, meu renascimento e o motivo do meu sorriso... eu sempre estarei aqui pra vocês ....*

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora e mestre, Prof. Dra. Amane Paldês Gonçalves, por toda paciência, ajuda, carinho e dedicação na confecção deste trabalho. Agradeço de coração!

Aos técnicos do 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), que me ajudaram na parte prática deste trabalho. Muito obrigada!

Aos veterinários do laboratório de Patologia Clínica da Universidade Metodista de São Paulo: Patrícia Moura Cunha Souza, Rodrigo Veroneze Domenech e Amanda Duarte e ao professor responsável pelo setor Prof. Dr. Milton Kolber...Vocês foram essenciais para execução deste trabalho...Obrigada pela paciência, carinho, colaboração ...Reconheço e valorizo tudo o que fizeram por mim...Muito obrigada!

Aos meus pais, por toda ajuda durante a execução deste trabalho, principalmente no cuidado com meus filhos, e por todo apoio e suporte que me deram ao longo desta jornada...

Ao meu marido, Vinicius, pelo companheirismo e suporte para conclusão deste projeto, além do amor e força que me proporciona, meus combustíveis diários

Aos meus filhos, Thiago, Bruno e Henrique... Vocês são as melhores partes de mim...Minha força e minha maior fraqueza!!!

Aos meus pacientes e seus tutores que contribuíram para a conclusão deste trabalho... Juntos somos mais fortes e caminhamos para uma evolução conjunta!

A todos os professores e mestres da Universidade Metodista de São Paulo, que contribuíram de alguma forma, para execução deste trabalho. Muito Obrigada!

*Existe uma lenda acerca de um pássaro que só canta uma vez na vida, com mais suavidade que qualquer outra criatura sobre a terra. A partir do momento em que deixa o ninho, começa a procurar um espinheiro-alvar e só descansa quando o encontra. Depois, cantando entre os galhos selvagens, empala-se no acúleo mais agudo e mais comprido. E morrendo, sublima a própria agonia e despende um canto mais belo que o da cotovia ou do rouxinol. Um canto superlativo, cujo preço é a existência. Mais o mundo inteiro pára para ouvi-lo, e Deus sorri no céu. Pois o melhor só se adquire a custa de um grande sofrimento... Pelo menos é o que diz a lenda.*

Collen McCallough

## RESUMO

Com o intuito de se estudar a predominância dos sorovares de leptospiros infectando cães com suspeita clínica de leptospirose, atendidos no município de São Bernardo do Campo, no Hospital Veterinário da Universidade Metodista de São Paulo, foram colhidas 14 amostras sanguíneas de cães com manifestações clínicas compatíveis com a doença. Pela prova de Soroaglutinação microscópica (SAM) realizada no laboratório 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), obtiveram-se quatro amostras positivas, com taxa de ocorrência de 28,57%, sendo o sorovar Copenhageni o mais prevalente em 75% dos casos e o sorovar Brastilava em 25% dos casos. Foram realizadas também análises hematológicas e bioquímicas no laboratório de Patologia Clínica da Universidade Metodista de São Paulo. Os achados clínicos laboratoriais neste estudo evidenciaram importante acometimento renal e hepático nos animais afetados com predominância do sorovar Copenhageni, além da ocorrência do sorovar Brastilava, o qual não se encontra presente na vacina e está causando doença clínica na região.

**Palavras – chave:** Leptospirose, cães, soroaglutinação microscópica

## **ABSTRACT**

In order to study the prevalence of leptospires serovars infecting dogs with clinical suspicion of leptospirosis, treated in the municipality of São Bernardo do Campo, at the Veterinary Hospital of the Universidade Metodista de São Paulo, 14 blood samples from dogs with clinical manifestations compatible with the disease were collected. It were realized the serologic microagglutination testing (MAT) at the Bacterial Zoonoses Laboratory of the Department of Preventive Medicine and Animal Health of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics (FMVZ) of the University of São Paulo (USP), four positive samples were obtained, with serovar Copenhageni being isolated in 75% of cases and serovar Brastilava in 25% of cases. Hematological and biochemical analyzes were also carried out at the Laboratory of Clinical Pathology of the Universidade Metodista de São Paulo. The laboratory and clinical findings in this study evidenced important renal and hepatic involvement in affected animals with predominance of serovar Copenhageni, in addition to the occurrence of the serovar Brastilava, which is not present in the vaccine and is causing clinical disease in the region.

**Key-words:** dogs, leptospirosis, serologic microagglutination testing

## Sumário

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 INTRODUÇÃO .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 1  |
| 1.1 Agente Etiológico .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 4  |
| Figura 1 – Ultraestruturas de Leptospiras patogênicas. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 5  |
| 1.1.1 Taxonomia e Classificação das Leptospiras.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 5  |
| 1.1.1.1 Classificação Sorológica.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 6  |
| Tabela 1 – Sorogrupos e alguns sorovares de <i>Leptospira interrogans</i> sensu lato .....                                                                                                                                                                                                                                                                | 7  |
| 1.1.1.2 Classificação Genotípica .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 7  |
| Recentemente, a análise genômica de um novo sorovar de <i>Leptospira weilli</i> sorogrupo Manhao foi descrita (XU et al., 2017), além do genoma completo da <i>Leptospira alstonii</i> sorovar Room22 estirpe GWTS #1 (NALLY et al., 2016) e <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Hardjo subtipo Hardjoprajitno estirpe Norma (COSATE et al., 2015)..... | 8  |
| Tabela 2 – Sorovares de leptospiras encontrados em múltiplas espécies de leptospiras .....                                                                                                                                                                                                                                                                | 9  |
| 1.2 Epidemiologia.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 9  |
| 1.2.1 Hospedeiros de Manutenção .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 10 |
| 1.2.2 Hospedeiros Acidentais.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 12 |
| 1.2.3 Transmissão.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 13 |
| 1.2.4 Fatores de risco para infecção .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 14 |
| 1.2 Patogenia.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 15 |
| 1.3.1 Patogenia Renal.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 17 |
| 1.3.2 Patogenia Endotélio Vascular.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 18 |
| 1.3.3 Patogenia Hepática .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 19 |
| 1.3.4 Patogenia Sistema Nervoso Central .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 20 |
| 1.3.5 Patogenia Pulmonar .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 20 |
| 1.4 Manifestações Clínicas .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 22 |
| 1.4.1Outras Manifestações .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 26 |
| 1.5 Diagnóstico .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 26 |
| 1.5.1 Diagnóstico Clínico .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 27 |
| 1.5.2 Patologia Clínica .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 27 |
| 1.5.2.1 Hemograma.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 27 |
| 1.5.2.2 Bioquímica Sérica e Hemogasometria .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 28 |
| 1.5.2.3 Parâmetros Hemostáticos .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 30 |
| 1.5.4.2. Urinálise .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 31 |

|                                                                                                                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.5.3 Diagnóstico por Imagem .....                                                                                                                                                               | 31 |
| 1.5.3.1 Radiografia Torácica .....                                                                                                                                                               | 32 |
| 1.5.3.2 Tomografia Computadorizada .....                                                                                                                                                         | 33 |
| 1.5.3.3 Ultrassonografia .....                                                                                                                                                                   | 33 |
| 1.5.4 Etiológico .....                                                                                                                                                                           | 33 |
| 1.5.4.1 SAM .....                                                                                                                                                                                | 34 |
| 1.5.4.2 Outros métodos sorológicos .....                                                                                                                                                         | 36 |
| 1.5.3 Identificação do micro-organismo .....                                                                                                                                                     | 37 |
| 1.5.3.1 Exame Microscópico .....                                                                                                                                                                 | 37 |
| 1.5.3.2 Cultura bacteriana .....                                                                                                                                                                 | 38 |
| 1.5.3.3 Detecção de DNA .....                                                                                                                                                                    | 39 |
| 1.5.6 <i>Post- Mortem</i> .....                                                                                                                                                                  | 41 |
| 1.5.6.1 Achados Macroscópicos .....                                                                                                                                                              | 41 |
| 1.6 Diagnóstico Diferencial .....                                                                                                                                                                | 42 |
| 1.7 Tratamento.....                                                                                                                                                                              | 42 |
| 1.7.1 Terapias Antimicrobianas.....                                                                                                                                                              | 42 |
| Tabela 4 – Antimicrobianos para o tratamento de leptospirose canina.....                                                                                                                         | 45 |
| 1.7.2 Tratamento Suporte e tratamento da Insuficiência Renal Aguda .....                                                                                                                         | 46 |
| 1.7.3 Tratamento da SHPL.....                                                                                                                                                                    | 48 |
| 1.7.4 Tratamentos dos Distúrbios de Hemostasia .....                                                                                                                                             | 48 |
| 1.8 Prognóstico.....                                                                                                                                                                             | 48 |
| 1.9 Profilaxia.....                                                                                                                                                                              | 49 |
| 1.9.1 Imunoprofilaxia .....                                                                                                                                                                      | 49 |
| 1.10 Considerações sobre Saúde Pública.....                                                                                                                                                      | 52 |
| 2 JUSTIFICATIVA .....                                                                                                                                                                            | 54 |
| 3 OBJETIVO .....                                                                                                                                                                                 | 55 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODO .....                                                                                                                                                                       | 56 |
| 4.1 População alvo .....                                                                                                                                                                         | 56 |
| 4.2 Coleta dos Materiais e Exames Laboratoriais .....                                                                                                                                            | 56 |
| Tabela 6 – Parâmetros hematológicos encontrados nos 10 cães com suspeita clínica de leptospirose, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Metodista de São Paulo – São Paulo 2018..... | 62 |
| Tabela 7 – Parâmetros bioquímicos encontrados nos 14 cães com suspeita clínica de leptospirose atendidos no hospital Veterinário da Universidade Metodista de São Paulo. ....                    | 64 |
| 6 DISCUSSÃO .....                                                                                                                                                                                | 66 |

|                                                                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 7 CONCLUSÃO .....                                                                                                                                              | 74 |
| 8 REFERÊNCIAS .....                                                                                                                                            | 75 |
| ADIN, C.A.; COWGILL, L.D. Treatment and outcome of dogs with leptospirosis: 36 cases (1990-1998).<br>J. Am. Vet. Med. Assoc., v.216, n.3, p. 371-5, 2000. .... | 75 |







## 1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de distribuição ubíqua, considerada reemergente em humanos e cães, causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira* spp. (LEVETT, 2001). Trata-se de uma enfermidade endêmica em regiões tropicais, com maior incidência após períodos chuvosos e inundações (HAAKE, LEVETT, 2015) presente em todos os continentes, exceto na Antártica. Evidências do transporte de *Leptospira* spp. foram encontradas em mais de 150 espécies de mamíferos (ADLER, MOCTEZUMA, 2010; KO, GOARANT, PICARDEAU, 2009).

A leptospirose é considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma doença negligenciada e subnotificada, transmitida pelo contato direto ou indireto com urina de animais infectados (ACHA, SZYFRES, 2003; FAINE, 1999; LEVETT, 2001). Os diferentes sorovares patogênicos de leptospirosas são mantidos na natureza pela infecção assintomática em animais silvestres e domésticos, conhecidos como hospedeiros de manutenção. (MONAHAN, MILLER, NALLY, 2009). Nas últimas décadas, a urbanização e as mudanças sociais tem favorecido o aumento da população canina nos países em desenvolvimento (SOUZA et al., 2002). Este aumento, associado com as relações emocionais e estreita convivência entre o homem o cão, constitui um grave problema de saúde pública, uma vez que os cães são capazes de transmitir uma série de zoonoses, dentre elas a leptospirose (BERGLER, 1988, ACHA; SZYFRES, 2003; BATISTA et al., 2004).

Os cães, depois dos roedores, são considerados como a segunda principal fonte de infecção para o homem (BROD et al., 2005). A dimensão da ocorrência da leptospirose humana no mundo não é totalmente compreendida, sabe-se que ela é a segunda zoonose mais prevalente e estima-se que ocorram mais de 1.500.000 casos e mais de 100.000 mortes por ano, considerando os casos não registrados (GLEAN, 2013). Na cidade de São Paulo, a média anual no período de 2001 a 2011, foi de 288 casos, 44 óbitos e letalidade de 15,5% (COVISA, 2013).

Estudos demonstram que a leptospirose canina está disseminada por todo o território brasileiro, apresentando maior ou menor prevalência dependendo da região estudada. Alguns estados realizaram estudos a respeito da soroprevalência de

*Leptospira* spp., que possibilitam a visualização desta situação. Na região Sudeste foram realizados estudos no estado de São Paulo, nos municípios de Botucatu e Avaré e no estado de Minas gerais, além de dois estudos em Uberlândia, com soroprevalência respectivas de 17,9%, 9,3%, 28,4% e 38% (SILVA et al., 2009; GONÇALEZ et al., 2010; CASTRO et al., 2011). Já na região Sul do Brasil, nos estados do Paraná, municípios de Jataizinho, Maringá, Curitiba e Umuarama, a soroprevalência observada foi respectivamente de 20,2%, 12,2%, 27,8% e 20% e no Rio Grande do Sul, a soroprevalência de leptospirose canina em Porto Alegre foi de 48,2% (BENITEZ et al., 2012; FONZAR, LANGONI, 2012; BIER et al., 2013; DREER et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2012). Por fim, na região Norte, no estado de Rondônia, na região Nordeste, nos estados de Sergipe, Bahia, Paraíba, e Região Centro-Oeste, no estado do Mato Grosso, foram demonstradas respectivamente as seguintes soroprevalências: 27,4%, 37%, 7,1%, 19,7% e 17,5% (AGUIAR et al., 2006; LEMOS, MELO, VIEGAS, 2010; LAVINSKI et al., 2012; AZEVEDO et al., 2011; JORGE et al., 2011).

Em São Paulo Yasuda, Santa Rosa e Yanaguita (1980) avaliaram um total de 1.428 cães errantes, encontrando soroprevalência para *Leptospiras* spp. de 21,6%, através da técnica de SAM. Em 2006, Modolo realizou uma investigação soroepidemiológica em 775 cães do município de Botucatu, obtendo positividade de 15,5% das amostras, com maior prevalência dos sorovares Canicola e Pyrogenes. Mais recentemente, em 2016, Masculli et al. realizaram um estudo na Estância Turística de Ibiúna, onde 570 animais de 4 regiões do município foram avaliados, e constatou-se uma soroprevalência de 32,8% e predominância dos sorovares Pyrogenes, Autumnalis e Canicola.

Atualmente no Brasil, observa-se uma diferença no perfil da leptospirose canina nas diferentes regiões. Nas regiões Sul e Sudeste há maior frequência de reagentes aos sorogrupos Canicola, Pyrogenes e ao sorovar Copenhageni, e mais raramente Autumnalis e Gryppotyphosa, enquanto que nas regiões Norte e Nordeste verifica-se maior frequência de reagentes ao sorogrupo Autumnalis, Copenhageni, Pyrogenes, Canicola e Gryppotyphosa. Tais variações possivelmente relacionam-se à existência de reservatórios, à exposição de cães ao risco de infecção, às particularidades climáticas, socioeconômicas e sazonais de cada região (HAGIWARA, MIOTTO, TOZZI, 2015; MELLO, MANHOSO, 2007). Porém ainda não

há estudos com amostragem probabilística e atualmente nota-se falta de padronização nos estudos já realizados.

Alguns países também realizaram estudos quanto à prevalência da leptospirose canina, tais como a Índia, no continente Asiático - em 1992, África do Sul, no continente africano – 1993, Irlanda - 1991 e Itália – 2002 no continente Europeu, nos EUA – 1996 na América do Norte, e por fim, na Argentina – 1997 representando a América do Sul. Nesses a prevalência encontrada foi respectivamente de 21% (com predominância dos sorovares Icterohaemorrhagiae e Canicola), 1,5% (com predominância dos sorovares Tarassovi e Pyrogenes), 25,44% (com predominância do sorovar Canicola), 31,2% (com predominância dos sorovares Bratislava e Grippotyphosa), 58,8% (com predominância dos sorovares Pomona, Autumnalis, Hardjo e Icterohaemorrhagiae) e 57% (com predominância dos sorovares Canicola e Pyrogenes) (VENKATARAMAN, NEDUNCHELLIYAN, 1992; MYBURGH, POSNETT, LAWRENCE, 1993; SCANZIANI et al., 2002; VAN DEN BROEK et al., 1991; HARKIN, GATRELL, 1996; RUBEL et al., 1997).

Em animais de produção, como rebanhos bovinos de corte e leite, a soroprevalência de leptospirose é alta, possuindo baixa taxa de mortalidade e alta taxa de morbidade (GUIMARÃES, 1982). Na região Centro-Oeste, Figueiredo et al. (2009) relataram soroprevalência de 90,4% no estado do Mato Grosso do Sul. Na região Norte, Homem et al. (2001) relataram prevalência de 97% no Pará e Aguiar et al. (2006) referiram prevalência de 95,5% nos rebanhos de Rondônia. Na região Sudeste, observou-se a prevalência de 71,3% no estado de São Paulo (CASTRO et al., 2008) e na região Nordeste, no estado da Bahia, de 77,93% (OLIVEIRA et al., 2009). Embora ainda não sejam conhecidos ou estimados os prejuízos econômicos proporcionados por esta doença no Brasil, relata-se grandes perdas de produtividade. No Reino Unido, alguns estudos constataram perdas de até 500 libras e 3% de abortos e natimortos para cada 100 cabeças de gado, devido à leptospirose (ELLIS, 1994), dado preocupante quando se extrapolam estes resultados ao número de animais que constituem o rebanho brasileiro.

Trata-se, portanto, de uma zoonose que reflete diretamente na saúde pública e economia do país. O controle da leptospirose canina em áreas urbanas é de grande interesse em saúde pública, principalmente devido à possível participação dos cães na cadeia epidemiológica da leptospirose humana. Os cães podem atuar como indicadores de contaminação ambiental e alertar quanto à introdução de um

novo sorovar de importância zoonótica (BLAZIUS et al. 2005). Dessa maneira, o cão torna-se um elemento importante na transmissão da doença, tanto para outros animais, quanto para o homem (LANGONI, 1999).

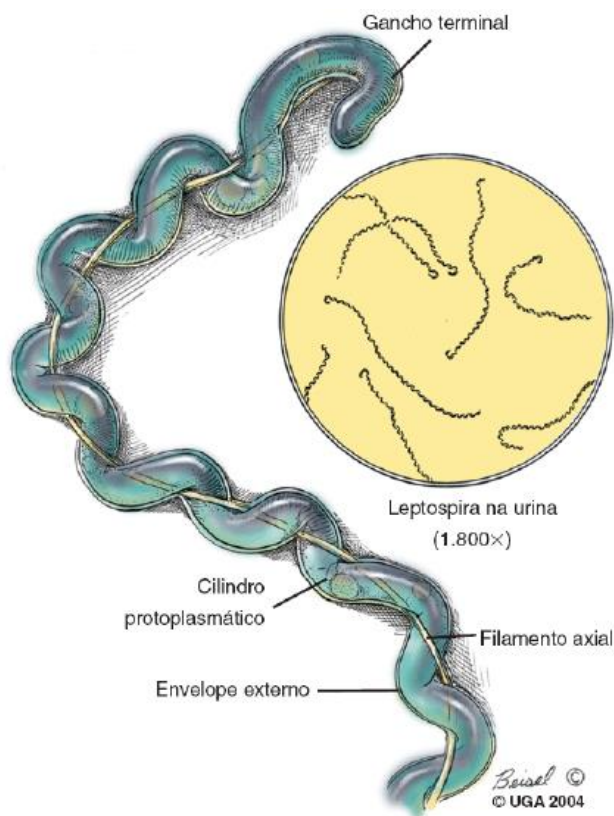
### 1.1 Agente Etiológico

*Leptospira* é um gênero de espiroquetas que inclui microorganismos com uma variedade de adaptações, desde saprófitos aquáticos à patógenos invasivos (HAAKE, MATSUNAGA, 2010). As leptospiras são bactérias finas, filamentosas (0,1 a 0,1  $\mu\text{m}$  de largura e 6 a 12  $\mu\text{m}$  de comprimento, flexíveis, espiraladas e com extremidades em gancho (figura 1), pertencentes à família Leptospiraceae, gênero *Leptospira* (GREENE et al., 2015)

As leptospiras coram-se positivamente pela coloração de Gram e apresentam motilidade caracterizada por movimentos de torção e flexão, simultâneos a movimentos rotatórios ao redor do eixo longitudinal. O microorganismo possui um cilindro citoplasmático circundado por uma membrana interna que recobre o filamento axial central, composto de dois flagelos periplasmáticos que não se sobrepõem e orientam-se longitudinalmente (GREENE et al., 2015). O cilindro espiralado interno e o filamento axial são envolvidos por uma membrana externa, composta principalmente por lipopolissacarídeos (LPS), múltiplas lipoproteínas antigênicas e proteínas transmembrana como porinas, secretinas e hemolisinas (BARNETT et al., 1999). Elucidar as características da membrana externa é a chave para compreender a estrutura, biogênese e nicho ecológico destes microorganismos (HAAKE, MATSUNAGA, 2010).

Diferentemente da maioria das espiroquetas invasivas, as leptospiras patogênicas devem ser capazes de sobreviver tanto em estados de vida livre, como adaptados ao hospedeiro. A membrana externa é a linha de frente da interação da bactéria com o ambiente e com o hospedeiro (HAAKE, ZÜCKERT, 2015). No hospedeiro, a membrana externa apresenta uma superfície coberta por adesinas e receptores, para que assim haja ligações e consequente adesão de moléculas hospedeiras desejáveis, tais como o regulador de complemento e fator H. Por outro

lado, a membrana externa deve permitir que as leptospiiras não sejam detectadas pelo sistema imunológico do hospedeiro (HAAKE, ZÜCKERT, 2015).



**Figura 1 – Ultraestruturas de Leptospiiras patogênicas.**

Fonte: (GREENE et al., 2015).

### 1.1.1 Taxonomia e Classificação das Leptospiiras

A nomenclatura e a taxonomia das leptospiiras são complicadas, pois, antes de 1989, foram classificadas inicialmente com base no seu isolamento em cultura e reatividade imunológica, sendo os sorovares antigenicamente relacionados agrupados em sorogrupos. Entretanto, uma reclassificação subsequente utilizou a tecnologia genética para uma classificação taxonômica mais relevante (DESVARS, CARDINALE, MICHAULT, 2010), que distingue 22 genoespécies de leptospiiras distribuídas entre patogênicas, de patogenicidade intermediária e saprófitas (ADLER, 2015).

Não há correspondência entre a classificação sorológica baseada em determinantes antigênicos e a classificação genotípica. Porém, a classificação sorológica atualmente continua sendo o único método universalmente disponível e recomendado pela OMS, com finalidades diagnósticas e epidemiológicas (HAGIWARA, MIOTTO, TOZZI, 2015).

#### **1.1.1.1 Classificação Sorológica**

Classicamente, o gênero foi dividido em duas espécies: *L. interrogans* sensu lato, que contém todas as cepas patogênicas, e *Leptospira biflexa* sensu lato, que contém todas as cepas saprofíticas do ambiente. Nesses dois grupos de leptospiros foram identificados diferentes sorovares, que são micro-organismos antigenicamente e, com frequência, epidemiologicamente distintos em determinada espécie (GREENE et al., 2015). Atualmente, são descritos mais de 250 sorovares de *L. interrogans*, distribuídos em 24 sorogrupos (tabela 1), dos quais pelo menos 10 são importantes em cães ou gatos (GREENE et al., 2015; LEVETT, 2001).

Os sorovares antigenicamente relacionados são agrupados em sorogrupos, os quais compartilham antígenos em comum e consequentemente apresentam reações cruzadas entre si nos métodos de detecção por anticorpos. Os sorogrupos não possuem uma base taxonômica, porém são úteis para inquérito epidemiológico e compreensão da doença, pois somente o isolamento da leptospira e sua caracterização com uso de anticorpos monoclonais permite identificar o sorovar infectante, e assim fornecer informações quanto aos reservatórios envolvidos na transmissão da infecção (HAGIWARA, MIOTTO, KOGIKA, 2015; LEVETT, 2001).

**Tabela 1 – Sorogrupos e alguns sorovares de *Leptospira interrogans* sensu lato**

| Sorogupo                 | Sorovar                                         |
|--------------------------|-------------------------------------------------|
| Icterohaemorrhagiae..... | Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Lai, Zimbabwe |
| Hebdomadis.....          | Hebdomadis, Jules, Kremastos                    |
| Autumnalis.....          | Autumnalis, Fortbragg, Bim, Weerasinghe         |
| Pyrogenes.....           | Pyrogenes                                       |
| Bataviae .....           | Bataviae                                        |
| Grippotyphosa.....       | Grippotyphosa, Canalzonae, Ratnapura            |
| Canicola .....           | Canicola                                        |
| Australis.....           | Australis, Bratislava, Lora                     |
| Pomona.....              | Pomona                                          |
| Javanica.....            | Javanica                                        |
| Sejroe.....              | Sejroe, Saxkoebing, Hardjo                      |
| Panama .....             | Panama, Mangus                                  |
| Cynopteri .....          | Cynopteri                                       |
| Djasiman.....            | Djasiman                                        |
| Sarmin .....             | Sarmin                                          |
| Mini .....               | Mini, Georgia                                   |
| Tarassovi.....           | Tarassovi                                       |
| Ballum.....              | Ballum, Aroborea                                |
| Celledoni.....           | Celledoni                                       |
| Louisiana .....          | Louisiana, Lanka                                |
| Ranarum.....             | Ranarum                                         |
| Manhao.....              | Manhao                                          |
| Shermani.....            | Shermani                                        |
| Hurstbridge.....         | Hurstbridge                                     |

Fonte: Adaptado de LEVETT, 2001.

### 1.1.1.2 Classificação Genotípica

Com o advento dos métodos moleculares, como o *multiple-locus sequence typing* (MLST) e o *multiple-locus variable - number tandem repeat analysis* (MLVA), refinaram as análises da heterogeneidade genética das leptospiros incluídas em um

mesmo sorogrupo. O MLST mostrou-se um método mais vantajoso em relação a outros métodos, devido à sua reprodutibilidade, consistência e portabilidade (AHMED et al., 2006).

Com base na hibridação de DNA foram definidas 22 genomoespécies de leptospiros (tabela 2), agrupadas em três grandes grupos: leptospiros patogênicos, leptospiros saprófitas e leptospiros intermediárias (ADLER, 2015).

As leptospiros patogênicas possuem dez espécies: *Leptospira interrogans* stricto sensu, *Leptospira kirschneri*, *Leptospira borgpeterseni*, *Leptospira santarosai*, *leptospiros noguchi*, *Leptospira weilii*, *Leptospira alexanderi*, *Leptospira kmetyi* e *Leptospira alstoni*, *Leptospira mayottensis*. As saprófitas possuem sete espécies e as intermediárias, as quais não possuem patogenicidade totalmente elucidada, que podem ser a causa da variedade de manifestações clínicas leves, são constituídas por cinco espécies (HAGIWARA, MIOTTO, TOZZI, 2015; BOURTHY et al., 2018).

Nessa classificação genética, sorovares tanto patogênicos quanto não patogênicos podem ocorrer na mesma genomoespécie. Alguns estudos incluíram estirpes múltiplas de alguns sorovares e constataram heterogeneidade genética dentro dos sorovares, conforme demonstra a tabela 3 (BRENNER et al., 1999).

Até 2008, encontravam-se disponíveis os genomas completos de seis estirpes de leptospiros, incluindo dois sorovares de *L.interrogans* (Lai e Copenhageni), dois estirpes de *L. borgpetersenii* sorovar Hardjo e dois estirpes de *L. biflexa* sorovar Patoc, com tamanho de genoma variando entre 3,9 a 4,6 Mbp (XUE, YAN, PICARDEAU, 2009).

Recentemente, a análise genômica de um novo sorovar de *Leptospira weilii* sorogrupo Manhao foi descrita (XU et al., 2017), além do genoma completo da *Leptospira alstonii* sorovar Room22 estirpe GWTS #1 (NALLY et al., 2016) e *Leptospira interrogans* sorovar Hardjo subtipo Hardjoprajitno estirpe Norma (COSATE et al., 2015).

**Tabela 2 – Sorovares de leptospiros encontrados em múltiplas espécies de leptospiros**

| Sorovar                  | Espécie                                                             |
|--------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| Bataviae.....            | <i>L. interrogans</i> , <i>L. santarosai</i>                        |
| Bulgarica.....           | <i>L. interrogans</i> , <i>L. kirschneri</i>                        |
| Grippotyphosa .....      | <i>L. kirschneri</i> , <i>L. interrogans</i>                        |
| Hardjo .....             | <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. interrogans</i> , <i>L. meyeri</i> |
| Icterohaemorrhagiae..... | <i>L. interrogans</i> , <i>L. inadai</i>                            |
| Kremastos.....           | <i>L. interrogans</i> , <i>L. santarosai</i>                        |
| Mwogolo.....             | <i>L. kirschneri</i> , <i>L. interrogans</i>                        |
| Paidjan.....             | <i>L. kirschneri</i> , <i>L. interrogans</i>                        |
| Pomona.....              | <i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i>                          |
| Pyrogenes.....           | <i>L. interrogans</i> , <i>L. santarosai</i>                        |
| Szwajizak .....          | <i>L. interrogans</i> , <i>L. santarosai</i>                        |
| Valbuzzi.....            | <i>L. interrogans</i> , <i>L. kirschneri</i>                        |
| .                        |                                                                     |

Adaptado de KOGIKA, HAGIWARA, MIOTTO, 2015.

## 1.2 Epidemiologia

Presume-se que a leptospirose seja a zoonose mais difundida no mundo (LEVETT, 2001). As leptospiros patogênicas estão amplamente distribuídas na natureza e vivem nos rins de uma ampla variedade de hospedeiros domésticos ou silvestres, considerados como hospedeiros de manutenção ou reservatórios (LEVETT, 2001). O ciclo de vida dessas bactérias envolve sua eliminação pela urina, persistência no meio ambiente, penetração em um novo hospedeiro, e disseminação hematogênica para os rins, através dos capilares glomerulares ou peritubulares. Uma vez no lúmen tubular renal, as leptospiros colonizam a borda em escova do epitélio tubular renal proximal, sem causar manifestações clínicas significativas no hospedeiro, sendo liberadas através da urina e podendo persistir no ambiente por longos períodos de tempo (HAAKE, LEVETT, 2015). Após a eliminação pela urina, essas bactérias sobrevivem em terrenos úmidos, pântanos, córregos, lagos e estábulos com excesso de detritos e umidade. Multiplicam-se em pH 7,2 a 7,4 e em

temperaturas de 10 a 34°C. São muito sensíveis ao pH ácido e à dessecação. As exigências de temperatura, pH e umidade para a sobrevivência prolongada das leptospiros, explica a incidência sazonal da leptospirose durante os períodos de chuva (WARD, 2002). A água quente estagnada ou de movimento lento, apesar de não ser essencial, proporciona um *habitat* apropriado para as espiroquetas. Nos ambientes aquáticos, as leptospiros formam biofilmes sobre superfícies orgânicas e inorgânicas que contêm agregados de micro-organismos em colônias (GREENE et al., 2015). Portanto, a incidência da doença é significativamente maior em regiões de clima quente quando comparadas a regiões temperadas, ressaltando ainda que a maioria dos países tropicais também são países em desenvolvimento, havendo maiores oportunidades de exposição a ambientes contaminados e animais infectados (LEVETT, 2001). Uma vez fora do hospedeiro, as leptospiros não se multiplicam, entretanto, caso os fatores ambientais sejam ótimos, podem permanecer viáveis por meses (LANGSTON, HEUTER, 2003).

As fontes de infecção são os hospedeiros de manutenção, os portadores assintomáticos e os portadores convalescentes (LANGONI, 1999).

### **1.2.1 Hospedeiros de Manutenção**

Existem dois tipos de hospedeiros mamíferos quando se trata de infecções por leptospiros: os hospedeiros de manutenção e os hospedeiros acidentais. Cada sorovar está adaptado a um ou mais hospedeiros, chamados de hospedeiros naturais ou de manutenção (tabela 3) (GOLDSTEIN, 2010).

O cão é considerado o hospedeiro natural do sorovar Canicola e o rato de esgoto, *Rattus norvegicus*, o hospedeiro natural dos sorovares Icterohaemorrhagiae e Copenhageni. Os suínos, bovinos e os animais silvestres são hospedeiros de manutenção dos sorovares Pomona, Hardjo e Grippityphosa, respectivamente. A ocorrência de diferentes sorovares de leptospiros no homem, no cão e nos outros animais domésticos e silvestres está na dependência de reservatórios existentes no ecossistema onde vive o hospedeiro acidental (HAGIWARA, 2003). Os hospedeiros de manutenção são essenciais para a persistência dos focos de infecção. Dentro da cadeia de transmissão, o homem é apenas hospedeiro acidental (BEPA, 2012).

A contaminação ambiental se dá pela eliminação de leptospiplas patogênicas pela urina, por meio da infecção crônica dos túbulos renais de hospedeiros de manutenção que, por definição, são espécies de mamíferos nos quais a infecção é endêmica e geralmente transmitida de um animal a outro por contato direto (LEVETT, 2001; LANGSTON; HEUTER, 2003).

Tais hospedeiros são tipicamente assintomáticos, sendo os pequenos roedores considerados os mais importantes. Todas as espécies de roedores, marsupiais, e mamíferos, incluindo o homem, podem atuar como hospedeiros de manutenção para leptospiplas patogênicas, excretando a bactéria na urina por um longo período (HAGIWARA, MIOTTO, KOGIKA, 2015; GREENE et al., 2015; GANOZA et al., 2010; MILLÁN et al., 2009).

Relatos esporádicos indicam que, após a infecção, humanos também podem excretar leptospiplas por um longo período de tempo, gerando a hipótese de que, assim como os animais, humanos podem desenvolver leptospiúria assintomática em locais onde há alta prevalência da doença, como na Amazônia Peruana (GANOZA et al., 2010).

Sabe-se que os cães são hospedeiros de leptospiplas patogênicas há mais de 80 anos (KLARENBECK; SCHUFFNER, 1933), sendo considerados hospedeiros de manutenção do sorovar Canicola e hospedeiros acidentais dos sorovares Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa, Copenhageni, Pomona, Australis, Wolffi, entre outros (GREENE et al., 2015). Em populações não vacinadas, a incidência de infecção pelo sorovar Canicola pode ser de 50 a 75% (BOLIN, 1996).

A identificação dos cães portadores constitui um grande desafio, devendo-se basear no isolamento do agente, bem como na sua identificação sorológica e molecular (LEVETT, 2001).

**Tabela 3 - Hospedeiros de manutenção de sorogrupos de *Leptospiras* spp.**

| <b>Sorogrupos</b>   | <b>Reservatórios</b>   |
|---------------------|------------------------|
| Icterohaemorrhagiae | Rato                   |
| Canicola            | Cão                    |
| Grippotyphosa       | Bovinos, Suínos, Gambá |
| Australis           | Rato, Camundongo       |
| Autumnalis          | Camundongo             |
| Hardjo              | Bovinos                |
| Batavia             | Cão, Rato, Camundongo  |
| Bratislava          | Rato, Suínos, Cavalos  |
| Cynopteri e Wolfi   | Morcego                |

Fonte: Adaptado de HAGIWARA, MIOTTO, KOGIKA, 2015.

### **1.2.2 Hospedeiros Acidentais**

Os hospedeiros acidentais são aqueles nos quais a infecção não é habitualmente observada, mas que podem adquiri-la em contato direto ou indireto com a urina de hospedeiros de manutenção e de outros animais infectados, podendo manifestar a doença de múltiplas formas e com intensidade variada (GREENE et al., 2015).

Os hospedeiros acidentais que sobreviverem a infecções agudas poderão apresentar uma colonização renal em longo prazo, com liberação do agente infectante na urina por meses a anos. Neles, a infecção pode resultar em doença aguda ou fatal, como também cursar de forma branda, dependendo do sorovar infectante (GOLDSTEIN, 2010; LANGSTON, HEUTER, 2003).

Embora os cães sejam conhecidos como portadores renais persistentes do sorovar Canicola, ainda não se determinou a duração da liberação de outros sorovares na urina desses animais (LANGSTON, HEUTER, 2003).

Em gatos, os relatos de leptospirose como doença clínica são raros, já que eles parecem ser menos susceptíveis que os cães a infecções espontâneas e acidentais (GREENE et al., 2015). Recentemente, a importância dos gatos liberando leptospiros patogênicas no ambiente e funcionando como fontes de infecção, ganhou mais atenção. Os felinos domésticos mais frequentemente tornam-se infectados alimentando-se de presas portadoras de leptospiros patogênicas, ou através do contato com a urina de contactantes caninos infectados (HARTMANN et al., 2013). A prevalência de anticorpos em gatos varia de 0 a 35% e infecções com vários sorovares foram identificados, incluindo Icterohaemorrhagiae, Canicola, Grippotyphosa, Pomona, Hardjo, Autumnalis e Ballum (RODRIGUEZ et al., 2012; MARKOVICH, ROSS, McCOBB, 2012).

Os ratos são os hospedeiros de manutenção do sorovar Icterohemorrhagiae, mas cães são frequentemente hospedeiros acidentais desse sorovar. No Brasil, o sorovar Copenhageni é citado na literatura como sendo o mais frequentemente envolvido nos casos de doença em cães (CORDEIRO, SULZER, 1983; RODRIGUES et al., 2007; FRAGA 2008) e em humanos (ROMERO, YASUDA, 2006), contudo, a maioria dos estudos de isolamento no Brasil não foram realizados a nível de sorovar.

### **1.2.3 Transmissão**

A transmissão da doença se dá por contato direto ou indireto. A transmissão direta ocorre por meio do contato da pele com a urina contaminada, através de abrasões, cortes ou mucosas, podendo ocorrer também por transmissão venérea, placentária, através de mordeduras ou ingestão de tecidos infectados (GREENE et al., 2015; LEVETT, 2001). Já a transmissão indireta ocorre por meio da exposição de animais e humanos susceptíveis a fontes de água, solo e alimentos contaminados (GREENE et al., 2015). Há evidência de sobrevivência das espiroquetas em insetos e outros invertebrados. Porém, a importância desse achado em relação à transmissão da doença é desconhecida (LANGSTON, HEUTER, 2003).

As leptospirosas patogênicas são mantidas no ambiente por hospedeiros de manutenção domésticos ou selvagens. Os hospedeiros acidentais tornam-se infectados através do contato direto com hospedeiros de manutenção ou pelo contato indireto com água e solo contaminados (SCHULLER et al., 2015a).

#### **1.2.4 Fatores de risco para infecção**

A análise dos fatores de risco para leptospirose aguda canina tem rendido resultados conflitantes, podendo ser submetidos a alterações temporais. Relatou-se um risco maior de infecção em cães machos não vacinados entre 4 a 10 anos de idade e em cães de trabalho, pastoreio, caça e sem raça definida, quando comparados a cães de companhia (LEE et al., 2014). Fatores de risco ambientais incluem viver nas proximidades de coleções líquidas, locais pantanosos, parques e florestas, possuir livre acesso à rua e ambientes externos, bem como proximidade entre os cães de abrigos, canis e santuários (HAGIWARA, MIOTTO, TOZZI, 2015). Um estudo realizado no município de Pelotas concluiu que cães mantidos em pátios abertos possuem risco duas vezes maior de contrair a doença, e que a ausência de sistema de esgoto na residência dos tutores dos cães foram os principais fatores de risco para a leptospirose (FURTADO et al., 1997).

Um estudo realizado na Suíça demonstrou um maior risco de ocorrência da infecção em cães filhotes, pois 20,5% dos cães analisados apresentaram idade inferior a um ano, possivelmente devido à superexposição ao ambiente durante a fase de socialização ou a uma lacuna temporal na imunidade (MAJOR et al., 2014). No estudo de Rissi e Brown (2014), o mesmo foi observado. Foram descritos dez casos de ocorrência natural de leptospirose aguda fatal e 90% dos cães infectados apresentavam idade inferior a seis meses de idade.

Já em humanos, as infecções podem ser adquiridas através de atividades recreacionais, ocupacionais e profissionais. O contato direto com animais infectados é responsável pela maioria das infecções em fazendeiros, veterinários, magarefes, entre outros. As atividades recreacionais incluem todos os esportes de água doce (LEVETT, 2001). As condições sanitárias e o estado de pobreza da população, as quais não possuem condições financeiras para manutenção do esquema de

manutenção de vacinação, são fatores predisponentes para a infecção e para surtos de leptospirose humana, estando os últimos associados a precipitações pluviométricas intensas e inundações, principalmente em condições precárias de habitação (HAGIWARA, MIOTTO, TOZZI, 2015).

## 1.2 Patogenia

A sequência de eventos após a infecção por leptospirosas patogênicas é surpreendentemente variável e depende de alguns fatores, como: a virulência, o sorovar e a estirpe, em adição à carga bacteriana infectando o hospedeiro e *status* vacinal (GOLDSTEIN, 2010). Um estudo realizado em cães de Nova York com infecção natural por leptospirosas demonstrou que a infecção por *L. interrogans* sorovar Pomona ocasiona doença renal significativamente mais severa e pior evolução, quando relacionados a infecções por outros sorovares (BROWN et al., 1996). Outro fator relacionado é a resposta imune. A exposição prévia a um mesmo sorovar provavelmente proporciona algum grau de imunidade, embora a duração da imunidade após infecção natural e o grau de proteção cruzada seja desconhecido em cães (GOLDSTEIN, 2010).

Os mecanismos pelos quais as leptospirosas causam doença ainda não são bem compreendidos, porém sabe-se que toxinas e enzimas produzidas pelas mesmas podem contribuir para sua patogenicidade (LANGSTON, HEUTER, 2003). Ao contrário de outras bactérias Gram negativas, as leptospirosas não causam doença fulminante logo depois do início da infecção, o que se deve ao baixo potencial endotóxico do lipopolissacarídeo (LPS) (WHERTS et al., 2001). Durante essa fase inicial, as leptospirosas evitam a resposta imune do hospedeiro, vinculando inibidores da ativação do complemento em sua superfície (BARBOSA et al., 2009). A leptospirose continua até que o hospedeiro elabore uma resposta imune adquirida efetiva, removendo o microorganismo da circulação sanguínea e da maioria dos tecidos. Após, as leptospirosas podem persistir em sítios imunologicamente privilegiados, como olhos e túbulos renais (LEVETT, 2001).

As leptospiplas penetram na pele e mucosas escoriadas, arranhadas ou amolecidas pela água. Uma vez dentro do ambiente mais aquecido do corpo de um mamífero, ocorrem alterações de transcrição que intensificam a patogenicidade da espiroqueta. Após entrar no espaço vascular, o que ocorre minutos depois da inoculação subcutânea, intramuscular ou intravenosa, os microorganismos multiplicam-se rapidamente e em seguida, disseminam-se e replicam-se em muitos tecidos, incluindo rins, fígado, baço, olhos, sistema nervoso central e trato genital, sendo o grau de lesão desses órgãos variável (figura 5) (GREENE et al., 2015; LANGSTON; HEUTER, 2003; GOLDSTEIN et al., 2010; MAELE et al., 2008). A fase de leptospiremia pode persistir por até dez dias e a presença de anticorpos neutralizantes anti-antileptospiplas (IgM e IgG) podem ser detectados na circulação sete ou oito dias após a infecção (GREENE et al., 2015).

Muitos animais desenvolvem mais de uma manifestação clínica. Pode ocorrer edema tecidual e vasculite nas infecções agudas e graves, que resultam em lesão endotelial aguda e manifestações hemorrágicas. O LPS das leptospiplas é um potente ativador dos macrófagos, que estimula a secreção da interleucina-1 e interferon por essas células, além de aumentar a sua capacidade bactericida. Este também estimula a aderência dos neutrófilos e a ativação das plaquetas, contribuindo para as anormalidades inflamatórias e distúrbios de coagulação. A incubação de células mononucleares do sangue periférico com LPS de leptospiplas resulta em liberação do fator de necrose tecidual  $\alpha$  e da interleucina-10 dependentes da dose. A expressão dessas citocinas, bem como do fator transformador de crescimento  $\beta$  e da citocina de recrutamento de células T, a proteína induzível de interferon-10, também foi detectada em modelos de infecção em hamsters. O fator de necrose tecidual  $\alpha$  e a proteína induzível 10 são citocinas pró-inflamatórias que podem desempenhar algum papel na resposta inflamatória às leptospiplas (GREENE et al., 2015)

O estudo de Xue, Yan e Picardeau (2009), comparou os genomas sequenciados de seis estirpes de leptospiplas, representantes de leptospiplas saprófitas e patogênicas, descritos até aquela data, com o intuito de obter informações sobre a evolução da virulência e mecanismos de sobrevivência utilizados por essas bactérias para persistirem em diferentes nichos ecológicos. Os autores constataram que a presença de variações nos genes do envelope celular

dos micro-organismos avaliados podem conduzir a diferenças importantes na virulência e/ou especificidade do hospedeiro destas bactérias e concluíram que muitos fatores de virulência putativos foram identificados nos genomas, no entanto, os seus papéis no que diz respeito à virulência e/ou resposta imune ainda devem ser estabelecidos.

### **1.3.1 Patogenia Renal**

As leptospiros penetram nos rins por via hematógica e migram do endotélio para o interstício, ocasionando edema e vasculite. Em seguida, podem ser vistas nas células dos túbulos contorcidos proximais e no lúmen dos túbulos, a partir dos quais são eliminadas na urina (MONAHAN et al., 2009). Durante a fase aguda da leptospirose as lesões renais predominantes são nefrite intersticial aguda, com necrose das células tubulares, apoptose e regeneração (NALLY et al., 2004). A nefrite intersticial é acompanhada de intenso infiltrado de células mononucleares no interstício renal e lesões glomerulares são praticamente inexistentes (LEVETT, 2001). Eventualmente, pode haver deposição mineral e calcificação da membrana basal e glomerular, decorrente da hiperfosfatemia, resultante da insuficiência renal aguda (KOGIKA, HAGIWARA, BACCARO, 1992).

No rim, um sítio imunologicamente privilegiado, ocorrerá a replicação das leptospiros, a despeito dos anticorpos circulantes, facilitando a colonização persistente das leptospiros, devido à ausência de complemento no interstício renal hipertônico (MONAHAN et al., 2009).

O edema renal interfere na perfusão sanguínea, com a consequente redução da filtração glomerular e comprometimento agudo da função renal. A lesão do endotélio vascular dos pequenos vasos pode resultar em dano isquêmico ao parênquima renal. Além disso, diversos fatores das leptospiros exercem efeito tóxico sobre as células do parênquima renal, tais como o LPS e outros componentes proteicos da membrana externa das leptospiros (GREENE et al., 2015)

O LPS das leptospiros é um potente ativador dos macrófagos, que estimula a secreção da interleucina - 1 e interferon por essas células, além de aumentar a sua

capacidade bactericida. A incubação de células mononucleares do sangue periférico com LPS de leptospiros promove liberação do fator de necrose tecidual  $\alpha$  e da interleucina-10, que também desempenham um papel na resposta inflamatória às leptospiros. As proteínas de membrana externa das leptospiros, como LipL32, induzem uma resposta inflamatória nas células tubulares proximais renais por meio de receptores *Toll-like* ou outros ligantes (HAAKE, ZÜCKERT, 2015). Os ácidos graxos insaturados da fração das leptospiros inibem especificamente a sódio-potássio adenosina trifosfatase ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase), o que pode responder pela depleção de potássio urinário. O mecanismo de concentração renal também pode ser comprometido pelos fatores endotóxico liberados pelas leptospiros, resultando em hipostenúria ou isostenúria (GREENE et al., 2015; HAGIWARA, MIOTTO, KOGIKA, 2015).

Classicamente, as infecções por vários sorogrupos como Canicola, Bratislava e Grippotyphosa têm sido associadas ao comprometimento predominantemente renal ou hepático em cães, enquanto os sorogrupos Icterohaemorrhagiae e Pomona estão mais relacionados à doença hepática (GREENE et al., 2015). Porém, no estudo realizado por Goldstein et al. (2006), o sorogrupo Pomona ocasionou doença renal mais severa e piores resultados, quando comparado a outros sorogrupo.

### 1.3.2 Patogenia Endotélio Vascular

Nas infecções rápidas e graves é passível a ocorrência de edema tecidual e vasculite, ocasionando lesão endotelial aguda e manifestações hemorrágicas típicas da Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) associada à sepse (GREENE et al., 2015). A Coagulação Intravascular Disseminada (CID) também pode ocorrer dentro de poucos dias após a infecção consequente a injúria endotelial aguda (GOLDSTEIN, 2010).

Várias hemolisinas foram identificadas em leptospiros patogênicas. A primeira delas (esfingomielinase C) foi purificada de *Leptospira borgpetersenii* de sorovar Hardjo. A esfingomielinase H induz a formação de poros nas membranas das células alvo e só é altamente conservada nas leptospiros patogênicas. A hemoglobinemia, a hemoglobinúria e a icterícia que se desenvolvem em bovinos com leptospirose

resultam de uma toxina hemolítica específica de sorovares, produzida por micro-organismos isolados do sorogrupo Pomona (GREENE et al., 2015)

Todavia, apesar de reconhecida existência de hemolisinas nos sorovares Hardjo e Pomona, a hemólise em outros hospedeiros, como os cães, é incomum, a despeito da existência de outros componentes de superfície de hemolíticos conhecidos (GREENE et al., 2015). Em um estudo realizado no Brasil em 1994, Santoro, Kogika, Hagiwara, Mirandola e Castelar demonstraram que 19 cães naturalmente infectados pelos sorovares Canicola e Icterohaemorrhagiae não demonstraram manifestações de anemia e hemólise.

### **1.3.3 Patogenia Hepática**

O fígado é outro órgão parenquimatoso importante que é danificado pelas leptospiros. Pode ocorrer disfunção hepática profunda sem alterações histológicas significativas devido à lesão produzida por toxinas das mesmas. Como não ocorre hemólise, o grau de icterícia na leptospirose, tanto canina quanto humana, é correspondente à gravidade da necrose hepática (GREENE et al., 2015).

A análise histopatológica do fígado revela hepatite colestática, degeneração e binucleação de hepatócitos, edema periportal com inflamação aguda e crônica, vasculite hemorrágica e necrose focal com desarranjo trabecular (HAGIWARA, MIOTTO, KOGIKA, 2015; SCHULLER et al., 2015a). Nas áreas de necrose, nota-se infiltrado com predomínio de células mononucleares (HAGIWARA, MIOTTO, KOGIKA, 2015). Podem ser visualizadas leptospiros no interior e exterior dos hepatócitos. Encontram-se hiperplasia e hipertrofia das células de Kupffer, e também há relatos de eritrofagocitose (LEVETT, 2001).

Documentou-se a hepatite ativa crônica como uma sequela na infecção pelo sorovar Grippotyphosa em cães (BISHOP et al., 1979). Na França, cães de uma colônia reprodutora da raça Beagle apresentaram doença semelhante associada à infecção pelo sorogrupo Australis (ADAMUS et al., 1997). Presumivelmente, a lesão hepatocelular inicial e a persistência do micro-organismo no fígado resultam em alteração da circulação hepática, fibrose e distúrbios imunológicos, que perpetuam a resposta inflamatória crônica. Esse processo pode causar fibrose hepática extensa e

falência hepática. Assim sendo, deve-se considerar a possibilidade de leptospirose em cães com inflamação e fibrose hepática (GREENE et al., 2015).

Em humanos, a hiperbilirrubinemia não foi associada à necrose hepatocelular, entretanto em hamsters experimentalmente infectados, a hiperbilirrubinemia coincidiu com a invasão das junções hepáticas intercelulares, através da migração das leptospiros e subsequente ruptura dos canalículos biliares (SCHULLER et al., 2015a; MIYAHARA et al., 2014). As formas ictéricas e não ictéricas de leptospirose são descritas em humanos, sendo que a primeira é considerada mais severa e rapidamente progressiva (LEVETT, 2001).

#### **1.3.4 Patogenia Sistema Nervoso Central**

Quando leptospiros invadem o Sistema Nervoso Central (SNC) durante a fase aguda da doença, ocorre uma meningite benigna. A incidência de cães com envolvimento do SNC é desconhecida, porém, em humanos, é bem documentada (GOLDSTEIN, 2010).

#### **1.3.5 Patogenia Pulmonar**

Os efeitos das toxinas do micro-organismo também podem ser observados no tecido pulmonar. A síndrome hemorrágica pulmonar associada à leptospirose (SHPL) é uma manifestação frequente da doença e está associada à alta mortalidade e morbidade. Em um estudo realizado por Kohn et al. (2010) foram avaliados 50 cães com leptospirose, e em 70% deles foram detectados alterações pulmonares. Nos últimos anos, a SHPL tem sido cada vez mais reconhecida em cães e outras espécies (KOHN et al., 2010; MAJOR et al., 2014). As alterações histopatológicas observadas entre espécies são similares e caracterizadas por vários graus de hemorragia interalveolar na ausência de um marcado infiltrado celular inflamatório ou vasculite. Edema interalveolar, fibrina e membranas hialinas, que são características de desordens com dano alveolar difuso, como a síndrome da angústia respiratória aguda (SARA), também podem estar presentes, contudo não

são características predominantes (SCHULLER et al., 2015a). Diferentemente do observado nos tecidos renais e hepáticos, observa-se a presença de poucas leptospiros no tecido pulmonar afetado de hospedeiros imunologicamente competentes (NALLY et al., 2004).

A patogenia da SHPL é pouco compreendida. Muitas hipóteses, tais como inflamação sistêmica, alterações auto-imunes e efeitos diretos das leptospiros estão sendo investigadas e é provável que os mecanismos patogênicos dessa síndrome sejam multifatoriais, envolvendo aspectos relacionados ao hospedeiro e ao patógeno (SCHULLER et al., 2015a). Os dois mecanismos mais frequentemente considerados em pacientes humanos são o efeito direto de uma toxina bacteriana não identificada na microvasculatura pulmonar e um efeito indireto mediado pela resposta imune do hospedeiro (DOLHNIKOFF et al., 2007).

Em 2004, Nally et al., isolaram amostras de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni obtidas de três pacientes humanos que morreram de hemorragia pulmonar severa e inocularam em cobaias suínos. Os animais desenvolveram áreas multifocais de hemorragia nos pulmões e superfície intestinal mesentérica, entretanto, o mesmo não ocorreu no fígado, baço ou rins. Nos pulmões, observou-se infiltrado médio a moderado de células mononucleares e neutrófilos, e raras leptospiros, detectadas através de microscopia eletrônica e imuno-histoquímica. Interessantemente, muitas leptospiros foram detectadas no fígado e rins desses animais, porém sem associação com fenômenos hemorrágicos. Com tal informação, os autores sugeriram que uma alta concentração bacteriana em determinado tecido não necessariamente ocasiona hemorragia.

Os resultados de outro estudo realizado com 26 cães com diagnóstico de leptospirose e SPHL demonstraram que houve deposição de IgG e IgM na maioria do tecido pulmonar desses animais, com percentagens respectivas de 76,9% e 73,1%, sustentando a hipótese de que há, em parte, um fator autoimune envolvido na patogênese da afecção, bem como ocorre em outras espécies de mamíferos (SCHULLER et al., 2015a).

Entretanto, provavelmente os mecanismos autoimunes não são os únicos fatores envolvidos na patogênese da SHPL, já que se demonstrou a ocorrência de severa SHPL em camundongos incapazes de produzir linfócitos T e linfócitos B

funcionais, após infecção experimental com *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni. Os autores concluíram que a ausência de linfócitos B e T funcionais não impede a ocorrência de hemorragia pulmonar, fornecendo fortes argumentos de que a hemorragia pulmonar na leptospirose não está relacionada apenas a mecanismos autoimunes (BANDEIRA et al., 2011).

Macroscopicamente, a hemorragia pulmonar multifocal difusa ocorre evidente (GREENE et al., 2015).

#### **1.4 Manifestações Clínicas**

Nos cães, a leptospirose é uma doença infecciosa aguda de início abrupto, cujas manifestações clínicas podem variar de quadros assintomáticos ou oligossintomáticos, leves e de evolução benigna, até formas graves, com alta letalidade. As duas formas mais observadas nos cães são a hepatonefrítica, causadas pelo sorovares Icterohaemorrhagiae e Copenhageni (sorogrupo Icterohaemorrhagiae), levando a comprometimento hepático e renal (KOGIKA, HAGIWARA, BACCARO, 1992; HAGIWARA, MIOTTO, KOGIKA, 2015) e a forma nefrítica causada pelo sorovar Canicola, que ocasiona comprometimento renal, porém, na forma de evolução benigna, ocorre nefrite intersticial crônica com eliminação de leptospiros por longos períodos de tempo (MASCOLLI, 2002). A síndrome hepatonefrítica também pode ser decorrente da infecção por sorovares patogênicos de outros sorogrupos, tais como Grippothyphosa, Pomona, Australis, Sejroe, Ballum, entre outros (HAGIWARA, MIOTTO, KOGIKA, 2015).

A gravidade da doença é influenciada pela idade do animal, virulência do sorovar, órgãos e sistemas acometidos, grau de exposição, *status* vacinal e pela resposta imune do hospedeiro (SYKES et al., 2011). Nos cães que conseguem sobreviver à fase aguda da leptospirose, as leptospiros atingem a luz dos túbulos contornados renais e passam a ser eliminadas pela urina por períodos de tempo variáveis, caracterizando a fase de leptospiúria. Desta forma, os cães e outros animais domésticos e silvestres, tornam-se uma importante fonte de infecção, sendo denominados portadores renais de leptospiros (VASCONCELLOS, 1987). A

leptospirúria pode ocorrer nos primeiros dias de infecção, antes mesmo dos anticorpos serem detectáveis no soro (BAL, et al., 1994).

O papel dos portadores renais, excretors de leptospiras, responsáveis pela persistência de focos no meio ambiente, é de grande relevância e importância epidemiológica, uma vez que esta condição pode ser de longa duração e por estes animais terem facilidade de deslocamento, pois na maioria das vezes não apresentam manifestações clínicas da infecção (VASCONCELLOS, 1993; CASTRO et al., 2016). Os rins são alvos das leptospiras durante infecções agudas e crônicas, onde condições nos túbulos renais favorecem a sobrevivências dessas bactérias (CASTRO et al., 2016).

As manifestações clínicas mais comuns são inespecíficas, e incluem êmese, anorexia e letargia (ADIN; COWGILL, 2000). Em 2007, Geisen et al., avaliaram 42 cães com leptospirose e as manifestações mais comuns foram: letargia (81%), anorexia (76%), êmese (57%), fraqueza (52%), diarreia (40%) e perda de peso (17%).

Em geral, animais mais jovens sofrem infecções mais graves que adultos (LEVETT, 2001). Em estudos experimentais, o período de incubação é de aproximadamente sete dias, podendo variar de acordo com o sorovar, imunocompetência do hospedeiro e carga bacteriana infectante (GREENLEE et al., 2005). Em alguns casos, o curso da infecção pode ser hiperagudo ou fulminante, com cães apresentando morte súbita por leptospiremia intensa (HAGIWARA, MIOTTO, KOGIKA, 2015).

Nas infecções agudas, as primeiras manifestações são febre (39,5°C a 40°C), calafrios e hipersensibilidade muscular generalizada. Subsequentemente, ocorrem vômitos, desidratação rápida e colapso vascular periférico. Foi observada a ocorrência de taquipnéia, pulso rápido e irregular e perfusão capilar deficiente. Essas manifestações são típicas da resposta inflamatória sistêmica associada à sepse. Os distúrbios de coagulação e as lesões vasculares são aparentes, com ocorrência de hematêmese, hematoquezia, melena, epistaxe e petéquias disseminadas. Os cães com doença terminal ficam deprimidos e apresentam hipotermia, não havendo tempo para o desenvolvimento de insuficiência renal e hepática (GREENE et al., 2015; HAGIWARA, MIOTTO, KOGIKA, 2015).

Cães com infecção aguda podem apresentar intussuscepção intestinal, já que a nefrite causada pela leptospirose altera a motilidade gastrointestinal

(SCHWEIGHAUSER et al., 2009). Portanto, os cães com vômitos e diarreia persistentes devem ser submetidos a uma cuidadosa palpação abdominal (GREENE et al., 2015). Em 2009, Schweighauser et al. relataram os casos de cinco cães infectados por *Leptospira interrogans* sorovar Australis que desenvolveram insuficiência renal aguda e intussuscepções intestinais.

As infecções subagudas caracterizam-se por anorexia, vômitos, desidratação, polidipsia, emagrecimento e em muitos casos, temperatura corpórea normal. A resistência à locomoção, e a hiperestesia paraespinal podem ocorrer devido à inflamação muscular, meníngea ou renal. A palpação abdominal pode indicar sensibilidade e desconforto, devido à inflamação visceral. Os rins podem estar dentro dos limites de seu tamanho de referência, ou ligeiramente aumentados e dolorosos à palpação. As mucosas podem apresentar-se congestas. A deterioração progressiva da função renal manifesta-se por oligúria ou anúria e por manifestações clínicas de síndrome urêmica, como gastroenterite urêmica, estomatite e necrose de língua. É possível que a função renal em alguns cães que sobrevivam à infecção subaguda normalize-se em 2 a 3 semanas, ou então se observa o desenvolvimento de doença renal poliúrica compensada crônica, com manifestações de poliúria e polidipsia, com subsequente evolução para síndrome urêmica (GREENE et al., 2015; HAGIWARA, MIOTTO, KOGIKA, 2015). Há ainda o relato de uma manifestação incomum de leptospirose em cão, com a presença de *diabetes insipidus* nefrogênica adquirida (ETISH, CHAPMAN, KLAG, 2014).

A icterícia nem sempre está presente, porém, quando notada, é indicativa de grave colestase intra-hepática secundária ao processo inflamatório do parênquima hepático (LEVETT, 2001). Cães com hepatite ativa crônica ou fibrose hepática crônica como sequelas da leptospirose podem demonstrar sinais francos de insuficiência hepática, incluindo inapetência crônica, perda de peso, ascite, icterícia ou encefalopatia hepática. Por vezes, ocorre doença hepática progressiva crônica sem sinal clínico de outro comprometimento orgânico (GREENE et al., 2015). A relação entre o sorovar infectante e a doença clínica, não está bem definida (GOLDSTEIN et al., 2006).

Em um estudo realizado na Suíça, 256 cães com diagnóstico de leptospirose aguda foram avaliados entre os anos 2007 e 2012. Destes, 99,6% apresentaram envolvimento renal, 76,7% apresentaram envolvimento pulmonar, 26% envolvimento

hepático e 18,2% apresentaram síndromes hemorrágicas (MAJOR, SCHWEIGHAUSER, FRANCEY, 2014).

Recentemente, uma forma de doença pulmonar grave também foi associada à infecção por esses patógenos (HAGIWARA, MIOTTO, TOZZI, 2015). Manifestações respiratórias tais como taquipnéia e dispnéia moderada a severa, podem ocorrer em cães com leptospirose, por inúmeras razões, incluindo edema pulmonar secundário à super-hidratação, pneumonia aspirativa, dor ou acidose metabólica, ou devido à SHPL. Cães com SHPL desenvolvem hemorragia intra-alveolar multifocal com rápida progressão, com consequente hemoptise maciça, insuficiência respiratória e taxa de mortalidade acima de 70% (KOHN et al., 2010). A frequência de hemorragia pulmonar vem aumentando em diferentes áreas geográficas do mundo, no entanto, não existe uma explicação clara para este fato (BANDEIRA et al., 2011).

Em um estudo, 15 cães com síndrome pulmonar hemorrágica semelhante à SHPL em humanos foram avaliados. Destes, seis possuíam diagnóstico para leptospirose *ante-mortem* e o PCR específico para leptospirose foi positivo em amostras *post-mortem* de tecido pulmonar, hepático ou renal de três cães (KLOPFLEISCH et al., 2010).

Em outro estudo prospectivo, 27 cães tratados para leptospirose apresentaram evidências radiológicas de SHPL. Destes, 44% apresentaram óbito em decorrência de severa dispnéia refratária, e a necropsia de três cães confirmou evidências macroscópicas e histológicas de SHPL (SCHWEIGHAUSER, FRANCEY, 2008).

Recentemente, Rissi e Brown (2014) descreveram as características diagnósticas de dez casos de leptospirose em cães e a necropsia confirmou o desenvolvimento de injúria alveolar pulmonar aguda, semelhante à SHPL humana, em quatro cães.

Os cães cronicamente infectados podem ser assintomáticos ou manifestar sintomas vagos e inespecíficos, sugestivos de doença renal crônica (HAGIWARA, MIOTTO, KOGIKA, 2015).

### **1.4.1 Outras Manifestações**

Apesar de raros, há relatos de ocorrência de uveíte em cães com leptospirose (TOWNSEND, STILES, KROHNE, 2006; GALLAGHER, 2011). Assim sendo, a doença pode ser subdiagnosticada em cães cuja única manifestação clínica seja a inflamação da úvea (GALLAGHER, 2011).

Em humanos, tem sido relatada a invasão dos músculos esqueléticos por leptospirosas, resultando em tumefação, vacuolização das miofibrilas e necrose focal (SPEELMAN, 1995). No estudo realizado por Wolffenbüttel et al. (2004), sete cães com diagnóstico de leptospirose foram avaliados e houve confirmação de lesão muscular em 71% desses animais, através da elevação da creatinina quinase (CK) e manifestações de mialgia abdominal, fraqueza e relutância à locomoção.

O aborto é um problema clínico em éguas, vacas e porcas, todavia, existem poucos relatos em cães. O aborto e a infertilidade foram associados à infecção por leptospirosas do sorogrupo Bratislava em porcas (ELLIS, THIERMANN, 1986) e o sorovar Buenos Aires do sorogrupo Djasiman, foi isolado de um feto abortado de uma cadela infectada (ROSSETTI et al., 2005).

Podem ocorrer manifestações cardíacas em cães gravemente acometidos. Os distúrbios do ritmo passíveis de serem identificados ao exame físico e as anormalidades eletrocardiográficas consistem em taquiarritmias ventriculares (GREENE et al., 2015).

Há relatos de calcificações severas sistêmicas e cutâneas em cães com leptospirose (MUNDAY, BERGEN, ROE, 2005; MICHEL et al., 2011).

## **1.5 Diagnóstico**

O diagnóstico de leptospirose baseia-se em informações obtidas na anamnese, no quadro clínico e nos exames complementares (HAGIWARA, MIOTTO, KOGIKA, 2015). Atualmente, na rotina clínica, a confirmação do diagnóstico clínico e epidemiológico se dá pelo isolamento do agente e pela pesquisa de anticorpos específicos no soro, por meio da reação de soroaglutinação microscópica (SAM) (LEVETT, 2001), considerado o teste de referência pela OMS (WHO, 2003).

### **1.5.1 Diagnóstico Clínico**

O diagnóstico clínico baseia-se na anamnese, histórico e manifestações clínicas. A apresentação clínica da leptospirose é variável, dependendo do curso da infecção, dos órgãos comprometidos e condição imunológica do hospedeiro. As informações sobre o contexto epidemiológico do local onde o cão vive também pode fornecer subsídios para o diagnóstico, bem como a presença de roedores sinantrópicos ou silvestres no ambiente e o hábito de caça (HAGIWARA, MIOTTO, KOGIKA, 2015).

Na fase inicial da doença as manifestações clínicas podem ser vagas e inespecíficas, indicando comprometimento sistêmico (LEVETT, 2001).

### **1.5.2 Patologia Clínica**

As alterações laboratoriais refletem o comprometimento dos órgãos parenquimatosos, sendo as mais evidentes aquelas relacionadas com o comprometimento renal e a disfunção resultante da presença prolongada de leptospiras nos túbulos renais, culminando com síndrome urêmica e acidose metabólica nos quadros agudos e terminais (HAGIWARA, MIOTTO, KOGIKA, 2015).

#### **1.5.2.1 Hemograma**

Nos casos típicos de leptospirose canina, os achados hematológicos são trombocitose e trombocitopenia. As contagens de leucócitos flutuam, dependendo do estágio e da gravidade da infecção. A leucopenia pode ocorrer na fase inicial de leptospiemia, evoluindo para a leucocitose, com desvio para a esquerda, na fase aguda da doença. Nos estágios mais avançados, as contagens de leucócitos variam habitualmente de 16.500 a 45.000 células/ $\mu$ L (GREENE et al., 2015). No diferencial de leucócitos geralmente se observa neutrofilia, linfopenia e monocitose

(SCHULLER et al., 2015a). Discreta anemia, normalmente arregenerativa, pode ser observada (HAGIWARA, MIOTTO, KOGIKA, 2015).

A ocorrência de trombocitopenia média a moderada é comum em cães com leptospirose, podendo ser consequente ao consumo, devido à ativação, adesão e agregação plaquetária decorrente da estimulação endotelial, à fagocitose pelas células de Kupffer, à destruição plaquetária imunomediada ou ao sequestro esplênico (SCHULLER et al., 2015a).

As causas de anemia na leptospirose podem ser decorrentes de perda sanguínea aguda via trato gastrointestinal ou respiratório, secundária à doença inflamatória, ou consequente à super-hidratação na insuficiência renal oligúrica ou anúrica, ou ainda, pela diminuição na produção de eritrócitos na doença renal crônica (LEE et al., 2000; GREENE et al., 2015). A hemólise devido ao efeito das toxinas leptospirais na membrana dos eritrócitos é rara em cães (SCHULLER et al., 2015b).

Em um estudo recente, Barthélemy et al. (2017) avaliaram as desordens hemorrágicas, hemostáticas e tromboelastométricas em 35 cães com diagnóstico de leptospirose e constataram que as anormalidades hematológicas mais comumente encontradas foram anemia, trombocitopenia, leucocitose e leucopenia com taxas de ocorrência respectivas de 86%, 60%, 17% e 6%. Neste estudo, foram observadas alterações hematológicas em 91% dos cães avaliados. Já no estudo de Wolffenbüttel et al. (2004) sete cães com leptospirose foram avaliados quanto aos achados clínicos laboratoriais e as alterações hematológicas mais frequentes foram, anemia, leucocitose e leucopenia, com taxas de ocorrência respectivas de 71,4%, 85,7% e 14,28%. E por fim, no estudo de Geisen et al. (2007), dos 42 cães com leptospirose avaliados, 45% apresentou anemia, 81% leucocitose e 53% trombocitopenia.

#### **1.5.2.2 Bioquímica Sérica e Hemogasometria**

A maioria dos cães com leptospirose apresentam azotemia (elevações nas concentrações séricas de uréia e creatinina) no momento da apresentação clínica, variando de acordo com o grau da lesão renal (HAGIWARA, MIOTTO, KOGIKA, 2015).

Pode-se observar hipoalbuminemia, em consequência à proteinúria ou SRIS (síndrome da resposta inflamatória sistêmica), e aumento da concentração sérica de globulina, devido à estimulação antigênica crônica da infecção prolongada, ou à desidratação superposta da insuficiência renal ou de ambas (GREENE et al., 2015)

As alterações eletrolíticas acompanham habitualmente o grau de disfunção renal e gastrointestinal, com ocorrência de hiponatremia, hipocloremia, hipopotassemia e hiperfosfatemia na maioria dos casos. Pode-se observar hiperpotassemia em cães com insuficiência renal oligúrica ou anúrica. A hipocalcemia discreta está relacionada com hipoalbuminemia e concentração diminuída da fração do cálcio ligado às proteínas. O pH do sangue e a concentração sérica de bicarbonato estão reduzidas nos animais gravemente acometidos, refletindo a existência de acidose metabólica (GREENE et al., 2015).

A lesão hepática é demonstrada pelo aumento nas atividades séricas de alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA). Aumento na atividade sérica de aspartato aminotransferase (AST) também pode ocorrer acompanhando as elevações da ALT, ou associada à injúria muscular. O aumento da concentração sérica de bilirrubina decorre da colestase intra-hepática e se deve principalmente à bilirrubina direta (BD) (HAGIWARA, MIOTTO, KOGIKA, 2015). O aumento na atividade da FA é, com frequência, proporcionalmente maior do que o da atividade da ALT (GREENE et al., 2015). A FA é uma enzima presente principalmente nos hepatócitos que revestem os canalículos e no epitélio dos ductos hepáticos. Assim sendo, seu aumento reflete colestase por obstrução intra-hepática em afecções hepáticas agudas (JOHNSON, 1997). Moderados aumentos de transaminases subsequentes a uma lesão hepática aguda, com diminuição rápida, sugerem hepatócitos pouco viáveis e gravemente lesados. A meia-vida curta dessas enzimas, em torno de três a cinco horas, contribui para seu aparecimento rápido e curto no soro, comparado com a FA, que tem meia-vida de 70 horas (MEYER, COLES, RICH, 1995).

Aumentos de creatinina quinase (CK) e troponina I são relatados em 44% a 69% dos cães com leptospirose, sugerindo injúria muscular e miocárdica, respectivamente (MASTRORILLI et al., 2007). Em humanos, relata-se o aumento da CK em mais de 50% dos casos de leptospirose (SPEELMAN, 1995).

Aumento nas atividades de amilase e lipase podem ser decorrentes de pancreatite ou enterite, mas também podem refletir diminuição na excreção renal dessas enzimas (MASTRORILLI et al., 2007).

No estudo de Wolffebutt et al. (2004), a bioquímica sérica dos animais avaliados revelou azotemia em 85,7% dos animais, hipoalbuminemia em 43%, hiperglobulinemia, aumento de ALT e AST em 28% dos casos, aumento de CK e FA em 71%, e houve aumento das concentrações séricas de bilirrubina total, bilirrubina direta e fósforo em todos os casos.

Em outro trabalho, realizado por Freire, Vargers e Lilenbaum, em 2008, foram avaliadas 120 amostras de sangue de cães com suspeita clínica de leptospirose. Destas, 88 apresentaram título para *Leptospira* spp. sorovar Icterohaemorrhagiae, através de SAM. Nestes animais, observou-se uma clara relação entre os títulos de anticorpos e a dosagem de FA e BD, pois em 87,5% houve aumento de FA e em 54,4% houve aumento de BD. Não houve diferença estatística significativa entre os animais positivos (88), animais negativos (32) e o grupo controle (constituído por 30 animais) em relação aos parâmetros de AST, ALT, gama glutamil transferase (GGT), colesterol, triglicerídeos (TG), proteína total, albumina, globulinas e bilirrubina indireta (BI).

### **1.5.2.3 Parâmetros Hemostáticos**

Na leptospirose de ocorrência experimental e natural em cães são observados graus variáveis de trombocitopenia, prolongamento do tempo de tromboplastina parcial ativado e tempo de protrombina, atividade reduzida da antitrombina, aumento da concentração do dímero D e aumento dos produtos de degradação do fibrinogênio. Em muitos cães os parâmetros da coagulação estão dentro dos limites de referência, ou a trombocitopenia variável pode ser a única anormalidade, sugerindo mecanismos hemostáticos compensados. O grau de trombocitopenia em cães com leptospirose tem sido correlacionado com a gravidade das manifestações pulmonares e maior taxa de mortalidade (GREENE et al, 2015). No estudo de Kohn et al. (2010) os autores constataram que ocorreu trombocitopenia em 83% dos cães com leptospirose e alterações pulmonares e em 53% dos cães sem manifestações pulmonares.

Têm-se relatado várias anormalidades hemostáticas em cães com leptospirose aguda, indicando a ocorrência de estados de hipercoagulação e hipocoagulação (FRANCEY, BAUER, SCHWEIGHAUSER, 2013). Em um estudo, 14% dos cães apresentaram trombocitopenia associada ao aumento do tempo de protrombina e tromboplastina parcial ativada, levando a suspeita de CID (KOHN et al., 2010). O aumento na concentração de fibrinogênio ocorreu em 75% dos cães, sendo consistente com uma resposta de fase aguda (MASTRORILLI et al., 2007).

No estudo de Barthélemy et al. (2017) as desordens hemostáticas ocorreram em 83% dos cães avaliados e os achados anormais no perfil de coagulação foram hiperfibrinogenemia (43%), prolongamento nos tempos de tromboplastina parcial ativada (23%), no tempo de protrombina (14%) e no tempo de trombina (14%), além de hipofibrinogenemia (20%) e aumento na concentração dos produtos de degradação do fibrinogênio (11%). Os pesquisadores concluíram ainda que a mortalidade significativamente foi menor em cães com perfil hipercoagulável (21%) quando comparados àqueles com perfil hipocoagulável (57%). O perfil hipocoagulável foi associado à trombocitopenia e hipofibrinogenemia. CID ocorreu em 23% dos casos e não foi considerado um fator prognóstico negativo neste estudo.

#### **1.5.4.2. Urinálise**

A glicosúria renal pode ser observada na fase aguda da leptospirose, indicando lesão tubular aguda. A proteinúria é variável, podendo ser detectadas proteínas de baixo ou alto peso molecular, indicando origem glomerular, com menor frequência, ou tubular, com maior frequência, devido à nefrite tubulointersticial, característica de leptospirose. Pode observar ainda bilirrubinúria e cilindros granulosos, leucócitos e hemácias no sedimento urinário (HAGIWARA, MIOTTO, KOGIKA, 2015). As leptospirosas não são identificadas na urina sem coloração especial ou microscopia de campo escuro (GREENE et al., 2015).

#### **1.5.3 Diagnóstico por Imagem**

Os exames de imagem são pouco conclusivos para o diagnóstico de leptospirose, porém podem contribuir para a exclusão de outras possíveis causas de doença (HAGIWARA, MIOTTO, KOGIKA, 2015). Porém, com o aumento dos relatos de manifestações clínicas pulmonares em cães, semelhantes à SHPL em humanos, os exames de imagem adquirem maior importância, considerando-se que nestes a SHPL é considerada uma das maiores complicações da leptospirose e está relacionada a um pobre prognóstico (PAGANIN et al., 2011).

#### **1.5.3.1 Radiografia Torácica**

Na radiografia de tórax de muitos cães são detectadas densidades alveolares intersticiais a nodulares, provavelmente associadas à hemorragia pulmonar em decorrência de lesão endotelial e vasculite. As lesões são mais efetivamente detectadas nos campos pulmonares caudodorsais. Ocorre regressão completa das lesões nos cães recuperados (GREENE et al., 2015).

Baumann e Flückiger (2001), quatro cães com diagnóstico de leptospirose e um cão com suspeita da doença foram submetidos a exames radiológicos, com o objetivo de caracterizar as alterações radiográficas observadas. Como resultado, observaram opacidade retículo nodular pulmonar em todos os cães, afetando todos os lobos pulmonares em três cães e afetando os campos pulmonares caudodorsais em dois cães. Tal padrão radiográfico pulmonar está associado a quadros de hemorragia pulmonar.

Em um estudo realizado na Alemanha, 50 cães com leptospirose foram avaliados e 70% dos cães apresentaram anormalidades pulmonares e concluíram que as anormalidades radiográficas podem estar presentes mesmo na ausência de manifestações respiratórias (KOHN et al., 2010). A radiografia torácica pode subestimar o tipo e a gravidade da lesão em cães com leptospirose, quando comparada à tomografia computadorizada (TC) (GENDRON et al., 2014).

### **1.5.3.2 Tomografia Computadorizada**

Em um estudo realizado na Suíça, dez cães com leptospirose foram avaliados quanto às características pulmonares através de TC seriadas. Em todos os cães, foram observadas lesões pulmonares em todos os lobos pulmonares, porém as lesões foram mais pronunciadas nos campos pulmonares caudodorsais. As lesões observadas foram espessamento peribronquiovascular e dilatação bronquiolar, áreas de consolidação pulmonar e lesões nodulares (figura 11), predominantemente centro-lobulares. Efusão pleural ou mediastinal ocorreu em 50% dos cães. A gravidade das lesões pulmonares não foi associada à sobrevida (GENDRON et al., 2014).

### **1.5.3.3 Ultrassonografia**

As anormalidades na ultrassonografia do sistema urinário de cães com leptospirose incluem, por ordem decrescente de prevalência, renomegalia, pielectasia, aumento da ecogenicidade cortical, acúmulo discreto de líquido perirrenal e banda medular de ecogenicidade aumentada. A banda ecogênica medular não é específica da leptospirose em cães e corresponde a uma região de edema, necrose e hemorragia renais, observada macroscopicamente e ao exame histológico. Alterações sugestivas de inflamação pancreática também podem ser detectadas na ultrassonografia do abdome (GREENE et al., 2015).

### **1.5.4 Etiológico**

O diagnóstico etiológico da leptospirose baseia-se indiretamente nos testes sorológicos, com avaliação do título de anticorpos produzidos, sendo que, a confirmação do diagnóstico da leptospirose pode ser realizada através de métodos diretos, como a visualização do micro-organismo em materiais biológicos (sangue, urina) ou tecidos, por meio de exame microscópico, cultivo bacteriano e/ou detecção

de material genético por técnicas moleculares, tais como a reação em cadeia polimerase (PCR) (HAGIWARA, MIOTTO, KOGIKA, 2015).

#### **1.5.4.1 SAM**

A SAM é a técnica padrão reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e o procedimento laboratorial mais difundido no diagnóstico da leptospirose. Atualmente, é utilizada universalmente para fins de diagnóstico clínico e, principalmente, epidemiológico. A técnica detecta anticorpos séricos antileptospiras e possuiu utilização limitada para quadros agudos, uma vez que, na primeira semana da doença não é possível a detecção de anticorpos (WHO, 2003; LANGONI, 1999; SCHULLER et al., 2015a; HAGIWARA, MIOTTO, KOGIKA, 2015).

A técnica consiste em reagir diluições seriadas do soro do animal com leptospiras vivas para detecção de anticorpos aglutinantes. Faz-se a triagem inicial diluindo-se (1:100) do soro com a salina tamponada. Após incubação com cada um dos antígenos representativos dos sorogrupos, as reações são observadas em microscopia de campo escuro. Os antígenos vivos utilizados nessa reação são provenientes de culturas de estirpes padrão, mantidas em meio líquido de Stuart, Ellinghaunser ou similares, as quais devem estar livres de contaminantes ou auto-aglutinação. As amostras que apresentarem aglutinação de mais de 50% do campo de visão são submetidas à sucessivas diluições em base geométrica de dois, procedendo-se novamente o teste contra o antígeno reagente. O título final é a recíproca da diluição em que é observada a aglutinação de 50% das leptospiras. Em geral, na bateria de antígenos, devem-se incluir os sorogrupos de maior importância epidemiológica na região geográfica onde vive o animal (HAGIWARA, MIOTTO, KOGIKA, 2015; FAINE et al., 1999).

A SAM possui marcantes limitações quanto à sensibilidade, especificidade e repetibilidade, especialmente se títulos únicos forem interpretados (FRAUNE et al., 2013). Trata-se de um ensaio específico para sorogrupos e não há discriminação entre reatividades em nível de sorovar. Entretanto, a sua capacidade de discriminar entre reatividades de sorogrupos é uma vantagem sobre outro ensaio

imunoenzimático ligado a enzima (ELISA do inglês *enzymelinked immunosorbent assay*), aglutinação em látex ou métodos de detecção indiretos com anticorpos fluorescentes. (GREENE et al., 2015). A SAM não discrimina os sorovares que apresentam reação cruzada entre si, devido à presença de epítomos compartilhados por sorovares do mesmo sorogrupo (LEVETT, 2003). Este ensaio requer conhecimentos significativos para realização, é realizado por uma variedade de laboratórios e não possui um padrão universal quanto aos antígenos utilizados. Sendo assim, há muita variação entre laboratórios nos resultados do exame (GREENE et al., 2015). No Brasil, os laboratórios incluem geralmente 18 a 24 representantes de sorogrupos patogênicos na bateria de antígenos (RODRIGUES et al., 2012).

O resultado da SAM indica o provável sorogrupo no qual o sorovar infectante está incluído, não especificando o sorovar infectante. O resultado do exame poderá ser falso-negativo, caso a infecção seja causada por leptospiros de sorogrupos que não estejam incluídos na bateria de antígenos (HAGIWARA, MIOTTO, KOGIKA, 2015).

Em estudos realizados em humanos, mesmo quando o sorogrupo infectante é incluído na SAM, os resultados podem identificar corretamente o sorogrupo responsável apenas em 50% dos casos (LEVETT, 2003).

Há reações cruzadas em baixos títulos entre diferentes sorogrupos. Dessa maneira, os resultados dos testes podem indicar positividade sorológica para mais de um antígeno. O título mais alto é interpretado como pertencente ao sorogrupo infectante (GREENE et al., 2015).

Quando há altos títulos para mais de um sorogrupo, as reações são denominadas “mistas”. Reações paradoxais podem ocorrer quando a resposta inicial for dirigida mais fortemente para um sorogrupo heterólogo e apenas tardiamente prevalece o título de anticorpos desenvolvidos contra o sorogrupo envolvido (HAGIWARA, MIOTTO, KOGIKA, 2015).

Títulos superiores a 800 podem ser indicativos de infecção ativa, caso o cão não tenha sido vacinado no período de quatro a seis meses. Títulos acima de 1.600 até 12.800 podem ser encontrados na fase aguda, persistindo por mais tempo, e são fortemente sugestivos de infecção recente. O Consenso do Colégio Americano de Medicina Veterinária Interna (ACVIM) recomenda a confirmação da infecção recente ou atual pela realização do teste de SAM em amostras pareadas coletadas com

intervalos de duas semanas, ou no momento da alta hospitalar, já que um único teste pode não detectar anticorpos na fase inicial da infecção ou pode conferir resultados falso-positivos após a vacinação ou exposição em áreas endêmicas (SYKES et al., 2011). Títulos vacinais não apresentam essa magnitude de variação. O aumento de quatro vezes do título inicial ou a conversão sorológica para um ou múltiplos sorovares é fortemente sugestiva de leptospirose (MILLER et al. 2011).

As vacinas induzem a formação de anticorpos aglutinantes que podem dificultar a interpretação dos títulos da SAM. Porém, no geral, esses títulos são baixos. As vacinas tetravalentes podem resultar na formação de anticorpos reagentes aos antígenos vacinais e também a antígenos do sorogrupo Bratislava e Autumnalis, que não estão inclusos na vacina. Portanto, os resultados da SAM devem ser avaliados em conjunto com o histórico vacinal do animal (HAGIWARA, MIOTTO, TOZZI, 2015).

O teste de SAM revela anticorpos aglutinantes predominantemente do tipo IgM, os quais não neutralizam completamente ou não são capazes de destruir o organismo, não sendo, portanto, indicados para avaliação da resposta vacinal e proteção conferida pelas vacinas (HARTMAN, 1984; GREENE et al., 2015).

Outro fator que pode interferir nos resultados da SAM é a terapia antimicrobiana, pois é possível que quando administrada numa fase muito inicial da evolução da doença, diminua a magnitude da elevação dos títulos. Após terapia antimicrobiana bem-sucedida, observa-se redução dos títulos de anticorpos de infecções ativas (GREENE et al., 2015).

Em 2013, Fraune, Schweighauser e Francey demonstraram que a SAM foi altamente precisa para diagnóstico de leptospirose em cães, apesar da baixa sensibilidade para diagnóstico precoce. Nesta referência, não houve benefício do PCR, realizado em amostras de urina e sangue para o diagnóstico precoce da afecção de cães pré-tratados com antibióticos.

#### **1.5.4.2 Outros métodos sorológicos**

Testes imunoenzimático (ELISA) específicos para detecção de IgG e IgM antileptospirais foram desenvolvidos tendo como antígeno o extrato bacteriano total

e se mostraram úteis para diferenciação entre infecção recente e resposta vacinal (RIBOTTA et al., 2000).

Em estudos experimentais títulos de anticorpos IgM ELISA aumentam em até uma semana após a infecção e os títulos máximos são alcançados em até duas semanas, com posterior declínio. Assim sendo, tais títulos são observados precocemente no curso da infecção, em paralelo aos títulos de anticorpos aglutinantes (SAM), com pico máximo em duas semanas pós-infecção (GREENE et al., 2015; HAGIWARA, MIOTTO, KOGIKA, 2015).

Os títulos de anticorpos IgG ELISA desenvolvem-se duas a três semanas pós-infecção. Nos cães vacinados, podem-se verificar altos títulos de IgG acompanhados de títulos baixos ou negativos de IgM, o que permite diferenciar as reações positivas pós-vacinais das infecções recentes (GREENE et al., 2015).

Entretanto, a SAM e ensaios ELISA requerem tempo e manutenção de uma série de antígenos vivos provenientes de cultura de estirpes representativas dos sorogrupos a serem testados, equipamentos especiais e técnicos treinados. Assim sendo, houve a necessidade de desenvolvimento de testes rápidos, precisos e de fácil execução, para detecção de IgM e diagnóstico de leptospirose aguda (LIZER et al., 2017). Ao longo dos anos, estão sendo desenvolvidos ensaios de fluxo lateral (EFL) para detecção de anticorpos IgM específicos para leptospirose no soro de cães (ABDOEL et al., 2011) e humanos (SMITS et al., 2001). Recentemente, um EFL para detecção de IgM e diagnóstico de leptospirose aguda em cães no local de atendimento foi descrito (*WITNESS® Lepto* – Zoetis), com sensibilidade e especificidade respectivas de 98% e 93,5%, sem interferência de vacinação prévia. Este teste imunocromatográfico fornece resultado em dez minutos (KODJO et al., 2016).

### **1.5.3 Identificação do micro-organismo**

#### **1.5.3.1 Exame Microscópico**

As leptospiros viáveis podem ser visualizadas diretamente em microscopia de campo escuro, em preparado fresco de urina, que permite a caracterização dos movimentos de contorção e flexão. Entretanto não é aconselhável o uso desse método como ferramenta diagnóstica única, devido à baixa sensibilidade e dificuldade de leitura do material pela presença de artefatos (GREENE et al., 2015; HAGIWARA, MIOTTO, KOGIKA, 2015).

Os micro-organismos podem ser observados ao microscópio óptico em cortes histológicos de tecidos ou em esfregaços secos ao ar, utilizando-se a coloração de Giemsa ou a impregnação com prata. Técnicas de imuno-histoquímica foram adaptadas para identificar leptospiros em impressões teciduais (*imprints*) de fígado e rim, e em líquidos orgânicos, como sangue ou urina (GREENE et al., 2015).

#### **1.5.3.2 Cultura bacteriana**

O cultivo bacteriano de sangue ou urina é pouco utilizado em decorrência do crescimento fatigioso das leptospiros e da suscetibilidade do micro-organismo às condições ambientais adversas, e deve ser realizado antes do início da terapia antimicrobiana. As culturas devem ser mantidas pelo tempo mínimo de 28 dias, antes de serem consideradas negativas (GREENE et al., 2015).

O sangue é a melhor amostra para cultura nos primeiros dez dias após infecção. Após esse período, as amostras de urina são mais indicadas, porém, devido à liberação intermitente do micro-organismo, são necessárias diversas amostras de urina. O método de coleta ideal é a cistocentese, pois a microbiota do trato urinário inferior interfere no crescimento das leptospiros. Durante o transporte até o laboratório, a amostra de urina deve ser alcalinizada, até atingir pH 8 e a semeadura, em meio apropriado, deve ser realizada em até duas horas após a coleta. As amostras de sangue devem ser coletadas em frascos estéreis, com heparina como anticoagulante (GREENE et al., 2015; HAGIWARA, MIOTTO, KOGIKA, 2015).

Tal método é o único capaz de identificar o sorovar infectante leptospiral, sendo portanto de extrema importância para determinação da composição local das vacinas em diferentes cenários epidemiológicos.

#### 1.5.3.3 Detecção de DNA

O PCR é uma técnica de detecção direta do agente etiológico que se baseia na amplificação de fragmentos de ácido desoxirribonucleico (DNA) do agente infeccioso a ser investigado em fluidos biológicos (HAGIWARA, MIOTTO, KOGIKA, 2015). Devido à alta sensibilidade, especificidade e velocidade de amplificação, a técnica mostra-se extremamente útil para detecção do microorganismo no sangue, urina ou fragmentos de tecidos (SCHULLER et al., 2015a).

Diversos ensaios de PCR tradicional forma descritos para o diagnóstico de leptospirose canina, tendo como alvo uma variedade de genes como *rrs* (16S) de *Leptospira interrogans* (MERIEN et al., 1992), *sec Y*, *Lip32* e *hap 1*, específicos para *Leptospira* spp patogênica (BRANGER et al., 2005). Recentemente, inúmeros ensaios de PCR em tempo real (qPCR) foram introduzidos na rotina, possibilitando a obtenção mais rápida do resultado, com maior sensibilidade analítica e com menores riscos de contaminação (BOURTHY et al., 2011).

Trata-se de um exame potencialmente vantajoso no curso inicial de infecções, momento este em que os ensaios de anticorpos são geralmente negativos, e também na confirmação de infecção ativa em animais com testes de anticorpos positivos e com histórico de vacinação contra leptospirose, pois a vacinação prévia não produz resultados falsos positivos no PCR (SYKES et al., 2011). Além disso, é considerado como o teste de escolha para identificar animais portadores crônicos e assintomáticos (BAL et al., 1994; SCHULLER et al., 2015a). Num estudo realizado na Irlanda para determinar a prevalência de eliminação renal através de amostras de urina de 525 cães, constatou-se que 7,05% apresentaram leptospirúria (ROJAS et al., 2010). Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de HARKIN et al. (2003), com 500 cães de 8,2% de eliminação da bactéria via urinária.

Na fase precoce da infecção, o sangue com anticoagulante é o material de escolha para realização do teste, e após dez a 14 dias, a urina. Entretanto, no estudo de Bal et al. (1994), os pesquisadores confirmaram a doença através do PCR feito em amostras frescas de urina em 90% dos pacientes humanos antes do oitavo dia de infecção. O DNA das leptospiras é relativamente estável e pode ser conservado a 4°C por sete dias (HAGIWARA, MIOTTO, TOZZI, 2015). A sensibilidade do teste é mais baixa em urinas congeladas (BRANGER et al., 2005).

Em um estudo experimental com 12 cães da raça beagle infectados com *Leptospira interrogans* sorovar Canicola, tanto a cultura e PCR lipL32/hap1 no sangue foram positivos no quarto dia de infecção e negativos subsequentemente, enquanto que a cultura e PCR lipL32/hap1 da urina foram negativas no quarto dia de infecção, e positivas no dia oitavo, décimo nono e vigésimo sexto dias de infecção (BRANGER et al., 2005).

Dessa maneira, o Consenso Europeu de leptospirose canina recomenda que os ensaios de PCR sejam realizados em amostras de sangue e urina, previamente à administração de antibióticos, em cães com suspeita clínica de leptospirose, independente da duração dos sinais clínicos (SCHULLER et al., 2015a). Num estudo recente de Fraune, Schweighauser e Francey (2013), 30 cães com diagnóstico confirmado de leptospirose apresentaram PCR negativo em amostras de sangue e urina, possivelmente devido à prévia administração de antibióticos.

A interpretação dos resultados de PCR depende do *status* da infecção em um animal clinicamente suspeito. Um resultado positivo indica que o DNA leptospiral está presente na amostra e um resultado positivo associado às manifestações clínicas é altamente sugestivo de leptospirose aguda. Um PCR positivo em amostra urinária indica eliminação renal, que ocorre tanto em animais com infecção aguda, quanto em portadores crônicos. Resultados negativos no sangue e urina não excluem o diagnóstico de leptospirose, já que a leptospiremia é transitória e a eliminação urinária pode ser intermitente (SCHULLER et al., 2015a).

Recomenda-se que os resultados desses ensaios sejam interpretados em conjunto com os resultados da SAM, na fase aguda e convalescente e de acordo

como o contexto médico específico, para melhorar a sensibilidade do diagnóstico (SYKES et al., 2011; HUGONNARD et al., 2011; GREENE et al., 2015).

A técnica mais recente de amplificação de DNA, denominada LAMP (*loop-mediated isothermal amplification method*), é outra ferramenta para o diagnóstico da leptospirose. O exame foi desenvolvido pela amplificação do gene *lipL41* que codifica a proteína da membrana externa LipL41, não depende do isolamento e cultura de leptospirosas, além de não apresentar reação cruzada com outras espécies de bactérias. Tal ensaio possibilita a otimização e redução de custos implicados nas técnicas tradicionais de identificação molecular de agentes infecciosos, e sua maior vantagem é a capacidade de amplificar o DNA alvo sob condições isotérmicas, geralmente entre 60 e 65°C, com alta especificidade, eficiência e velocidade. Porém, sua aplicação em amostras clínicas é restrita e a sua padronização está em curso (LIN et al., 2009).

#### **1.5.6 Post- Mortem**

##### **1.5.6.1 Achados Macroscópicos**

As lesões macroscópicas externas variam acentuadamente, dependendo da gravidade da doença, e podem consistir em congestão e icterícia das mucosas, com petéquias difusas. Observam-se ulcerações focais na língua e na cavidade bucal, secundárias à uremia. Pode haver aumento do tecido tonsilar ou linfóide. Em animais com infecção aguda, os rins estão aumentados, apresentam coloração pálida ou amarela acinzentada e formam uma protuberância na superfície de corte. A cápsula renal pode ser aderente à superfície do rim com possível presença de hemorragias subcapsulares e a pelve renal frequentemente está dilatada. Nos casos menos agudos, são observadas manchas brancas focais no córtex renal, na superfície de corte, com ocorrência mais proeminente ao longo da junção córtico-medular. Em cães cronicamente infectados ou tratados e recuperados, os rins podem estar retraídos e com cicatrizes (GREENE et al., 2015).

O fígado pode estar aumentado de volume, icterico, friável e com bordos interlobares arredondados. O trato respiratório pode estar edemaciado, com

congestão ou hemorragia pulmonar, com petéquias e equimoses em superfície pleural. No intestino, pode-se observar necrose, hemorragia e intussuscepção. O baço pode apresentar-se pálido e retraído (GREENE et al., 2015).

## **1.6 Diagnóstico Diferencial**

A leptospirose deve ser incluída no diagnóstico diferencial entre cães com doença renal aguda associada ou não à icterícia, uveíte, hemorragia pulmonar, doença febril aguda, abortamento e doença renal crônica (HAGIWARA, MIOTTO, KOGIKA, 2015).

## **1.7 Tratamento**

O tratamento da leptospirose canina baseia-se na terapia antimicrobiana específica e terapia de suporte (HAGIWARA, MIOTTO, KOGIKA, 2015).

### **1.7.1 Terapias Antimicrobianas**

Os consensos americano e europeu recomendam que a leptospirose canina seja tratada com doxiciclina como antibiótico de primeira escolha, na dose de 5 mg/kg a cada 12 horas ou 10 mg/kg a cada 24 horas, por via oral ou intra-venosa, durante 14 dias. Caso êmese ou outras reações adversas impeçam a administração de doxiciclina, recomenda-se a utilização de ampicilina na dose de 20 mg/kg por via intra-venosa a cada seis horas, ou penicilina G na dose de 25.000 a 40.000 UI/kg a cada 12 horas, por via intravenosa, ou ainda, amoxicilina na dose de 20 a 30 mg/kg a cada seis ou oito horas, devendo-se reduzir a dose para pacientes azotêmicos (SCHULLER et al., 2015a; SYKES et al., 2011).

Recomenda-se o uso de antibióticos em cães suspeitos de leptospirose, mesmo antes da confirmação do diagnóstico, devido severidade das manifestações clínicas e potencial zoonótico da afecção (SCHULLER et al., 2015a).

Em um estudo que utilizou PCR quantitativo para detecção de leptospirosas, três antimicrobianos foram avaliados: ofloxacino, ampicilina e doxiciclina. O primeiro foi incapaz de remover as leptospirosas dos rins e sangue de um hamster. O segundo não removeu as leptospirosas dos rins e o último removeu os patógenos dos três sítios, no decorrer de três dias de infecção (TRUCCOLO et al., 2002). O uso precoce de doxiciclina é recomendado por promover rápida eliminação das leptospirosas do tecido renal e sua dose não necessita de ajuste em pacientes com comprometimento renal agudo, haja vista que tal antibiótico é excretado principalmente nas fezes (GREENE et al., 2015).

Outro estudo recente avaliou a utilização de cefalosporinas de primeira geração (cefazolina e cefalexina) no tratamento de leptospirose aguda em hamsters experimentalmente infectados e demonstrou a efetividade dessas drogas neste modelo animal. No estudo em questão, os grupos de animais tratados com administrações intra-peritoneais de cefalosporinas por cinco dias apresentaram aumento da sobrevivência quando comparados à animais não tratados, não havendo também diferença estatística significativa na sobrevivência, quando comparados ao grupo de animais tratados com doxiciclina. Assim sendo, os autores concluíram que tal classe de medicamento pode ser uma terapia alternativa para o tratamento de leptospirose (HARRIS et al., 2011). Entretanto, no estudo no Alexander e Rule (1986), animais do mesmo modelo experimental tratados com apenas uma dose de cefalexina por via oral não sobreviveram, e Sykes et al. (2011) citam que o tratamento para leptospirose com cefalosporinas de primeira geração aparentemente é menos efetivo. Já o tratamento com cefalosporinas de terceira geração em humanos, tais como ceftriaxona e cefotaxima, é tão efetivo quanto o tratamento com penicilina (PANAPHUT et al., 2003). Recentemente, em um estudo experimental em hamsters, demonstrou-se que o antibiótico cefepima, cefalosporina de quarta geração, apresentou benefícios quanto à sobrevivência em relação à doxiciclina, antibiótico preconizado para o tratamento da leptospirose (ZHANG et al., 2014).

As penicilinas e derivados são antibióticos de escolha para interrupção da leptospiremia, porém não depuram completamente os micro-organismos albergados nos rins. Devem ser administradas por via parenteral em pacientes urêmicos, com comprometimento hepático ou que apresentem êmese (GREENE et al., 2015). Não se recomenda a administração de ampicilina por via oral devido à variabilidade de absorção gastrointestinal do fármaco (SYKES et al., 2011). Uma vez alcançada a melhora clínica e estando o paciente apto para receber alimentação e medicamentos por via oral, tais medicamentos podem ser substituídos por doxiciclina (HAGIWARA, MIOTTO, KOGIKA, 2015).

As fluoroquinolonas demonstraram pouca eficácia no tratamento da doença, quando comparadas à doxiciclina em modelos experimentais de roedores e não são indicadas para o tratamento de cães com leptospirose (TRUCCOLO et al., 2002). Orbifloxacino não foi efetivo no tratamento de um cão com leptospirose, que respondeu ao tratamento com amoxicilina (GREENE et al., 2015). O Estudo de Wu et al. (2017) demonstrou que hamsters tratados com baixas doses de ciprofloxacina e norfloxacina apresentaram piora do quadro clínico, com aumento da carga bacteriana e agravamento das lesões teciduais nos órgãos alvos, com consequente diminuição da sobrevida, quando comparados à animais não tratados.

Há relato do caso de um cão com leptospirúria persistente, apesar de tratamentos sequenciais com penicilina e doxiciclina. Após sete dias de tratamento com o último, a despeito da melhora clínica, ainda se observou leptospirúria, havendo resolução completa somente após a associação de estreptomicina à terapia (JUVET et al., 2011).

Os aminoglicosídeos são altamente eficazes para eliminar o estado de portador renal em cães, porém não devem ser administrados com essa finalidade até que os testes de função renal tenham retornado aos valores de referência (GREENE et al., 2015). Os fármacos ineficazes para o tratamento da doença em incluem sulfonamidas e cloranfenicol (SYKES et al., 2011; GREENE et al., 2015).

Na tabela 4, encontram-se listados os principais antimicrobianos indicados no tratamento da leptospirose canina.

O papel dos antimicrobianos no tratamento da leptospirose em humanos é controverso, e se introduzidos após quatro a sete dias do início da doença, são menos efetivos em promover recuperação clínica. Entretanto, a OMS recomenda que todos os pacientes humanos com leptospirose sejam tratados com antibióticos. Frequentemente utilizam-se penicilinas e doxiciclina para o tratamento da doença nesta espécie (SYKES et al., 2011). A azitromicina também é eficaz para o tratamento da leptospirose humana (PHIMDA et al., 2007), porém sua eficácia em cães ainda é incerta (HAGIWARA, MIOTTO, KOGIKA, 2015).

**Tabela 4 – Antimicrobianos para o tratamento de leptospirose canina.**

| <b>Antimicrobiano</b> | <b>Dose</b>              | <b>Via</b>    | <b>Intervalo (horas)</b> | <b>Duração (semanas)</b> |
|-----------------------|--------------------------|---------------|--------------------------|--------------------------|
| Doxiciclina           | 5mg/kg                   | VO            | 12                       | 3                        |
| Penicilina G          | 25.000 – 40.000<br>UI/kg | IM, SC,<br>IV | 6 a 8                    | 3                        |
| Ampicilina            | 22 mg/kg                 | SC, IV        | 6 a 8                    | 3                        |
| Amoxicilina           | 10 – 20 mg/kg            | VO            | 8 a 12                   | 3                        |
| Tetraciclina          | 22 mg/kg                 | VO            | 8                        | 3                        |
| Azitromicina          | 20 mg/kg                 | VO            | 24                       | 3                        |

Fonte: Adaptado de HAGIWARA, MIOTTO, KOGIKA, 2015.

### 1.7.2 Tratamento Suporte e tratamento da Insuficiência Renal Aguda

O tratamento de suporte para animais com leptospirose depende da gravidade da infecção e da existência de disfunção renal e hepática, bem como de outros fatores que causam complicações, como a ocorrência de desidratação, choque e hemorragia pulmonar em animais gravemente acometidos. Nos cães com a forma aguda da infecção, as providências iniciais devem ser direcionadas à administração de fluidos para manutenção do débito urinário e correção da desidratação, desequilíbrios hídricos, eletrolíticos e ácido-base (HAGIWARA, MIOTTO, KOGIKA, 2015; SCHULLER et al., 2015a). Deve-se tomar cuidado particular para evitar a hiper-hidratação em animais com oligúria ou anúria, o que exacerba a disfunção de órgãos como pulmões, trato gastrointestinal, cérebro e pâncreas. Além disso, o aumento da pressão no parênquima renal aumenta a já comprometida perfusão renal e a filtração glomerular (SCHULLER et al., 2015a).

A alimentação oral deve ser suspensa em animais com quadros de êmese, cujas causas químicas e viscerais são respectivamente a uremia e a gastrite urêmica. Podem ser necessários antieméticos de ação central e protetores gástricos, tais como bloqueadores de receptores  $H_2$  e inibidores de bomba de prótons, por via parenteral. Caso haja hipoalbuminemia grave ou suspeita de pancreatite, pode-se proceder com transfusões de plasma, para promover aumento da pressão oncótica vascular. A hidratação deve ser ajustada de acordo com o débito urinário do paciente (GREENE et al., 2015). O tratamento das complicações gastrointestinais deve ser adicional ao tratamento da hipertensão sistêmica e manejo da dor, sendo o último particularmente importante nas fases iniciais da doença, quando as dores renais, musculares, articulares e gastrointestinais podem contribuir significativamente para às manifestações clínicas da doença, recomendando-se assim a utilização de opióides, tais como bupremorfina e fentanil (SCHULLER et al., 2015a).

Recomenda-se a realização de nutrição enteral em cães com anorexia, devido ao suporte nutricional precoce e eficiente, com mínimos riscos de complicações. Em cães com vômitos persistentes torna-se necessária a nutrição parenteral (LANGSTON, 2010; SCHULLER et al., 2015a).

O tratamento de cães com leptospirose e insuficiência renal aguda (IRA) geralmente segue as mesmas recomendações para o tratamento de IRA decorrente de outras etiologias. O tratamento pode, em alguns casos, resultar em poliúria abrupta e profunda, com marcada perda de eletrólitos, na fase de recuperação renal. Portanto, os cães podem apresentar rápidas mudanças nos requerimentos de fluidos, variando de metade do nível de manutenção durante a anúria (1ml/kg/hora) até mais de dez vezes o nível de manutenção (acima de 20 ml/kg/hora) na fase poliúrica de recuperação renal (LANGSTON, 2010).

A oligúria (fluxo urinário inferior a 0,5 ml/kg/hora) deve ser definida somente quando o animal estiver normovolêmico. Podem-se recomendar diuréticos osmóticos, tais como glicose a 10 ou 20%, ou manitol, entretanto não devem ser administrados em pacientes hiper-hidratados. Diuréticos potentes, como a furosemida, são indicados no caso de oligúria persistente e a administração de dopaminérgicos não tem mostrado eficácia (HAGIWARA, MIOTTO, KOGIKA, 2015).

As terapias de substituição renal, tais como diálise peritoneal e hemodiálise, são necessárias para superar o tempo de recuperação renal na IRA (LANGSTON, 2010) e seu uso é recomendado pelo Consenso Europeu de leptospirose em cães e gatos, na forma severa de insuficiência renal. A leptospirose é considerada uma das melhores indicações para tais terapias, devido ao prognóstico favorável para recuperação renal e curta duração da falência renal severa (SCHULLER et al., 2015a). No estudo de Adin e Cowgill (2000), 36 cães com leptospirose foram avaliados, sendo 14 submetidos à hemodiálise e 22 a tratamento conservativo. O índice em ambas as terapias foi semelhante (86% e 82%, respectivamente), sendo que o índice de recuperação em cães com severa azotemia que não responderam ao tratamento conservativo foi superior a 80%.

A recuperação renal gradual geralmente ocorre duas a quatro semanas do início da diálise. Hemodiálise precoce tem sido associada ao aumento da sobrevida e diminuição do tempo de hospitalização em pacientes humanos com leptospirose (CERQUEIRA et al., 2008).

### **1.7.3 Tratamento da SHPL**

Dependendo do grau de comprometimento pulmonar, torna-se necessário oxigenioterapia, e em casos mais severos, ventilação mecânica. Transfusões de plasma ou sangue total são indicadas apenas em casos de distúrbios de hemostasia (SCHULLER et al., 2015a).

Baseado na hipótese de mecanismos imune- mediados envolvidos na patogenia da afecção, em pacientes humanos têm-se investigado a imunomodulação, apresentando resultados preliminares promissores com a utilização de pulsoterapia com metiprednisolona, ciclofosfamida e trocas plasmáticas (TRIVEDI et al., 2010). O uso de ciclofosfamida apresentou resultados favoráveis quanto ao prognóstico em pacientes humanos no estudo de Trivedi et al. (2010), pois dos 33 pacientes tratados com o fármaco, 66, 7% sobreviveram, enquanto que dos 32 pacientes que não foram tratados com a medicação, apenas três (9,4%) sobreviveram. Em cães não há informações sobre a eficácia desse fármaco e o tratamento das complicações pulmonares com dexametasona também não melhora o prognóstico (SYKES et al., 2011).

### **1.7.4 Tratamentos dos Distúrbios de Hemostasia**

A trombocitopenia raramente requer terapia específica. As transfusões de plasma são as principais opções terapêuticas para cães com leptospirose e CID. Recomenda-se a utilização de heparina somente em casos de cães com CID e claro estado de hipercoagulação sanguínea (SCHULLER et al., 2015a).

## **1.8 Prognóstico**

O prognóstico da leptospirose é bom em cães com tratados precocemente, com antibióticos apropriados e terapia suporte adequada, podendo haver sobrevida

superior a 80% dos casos submetidos à hemodiálise. Exceções constituem os casos associados a complicações respiratórias (HAGIWARA, MIOTTO, KOGIKA, 2015).

## **1.9 Profilaxia**

A profilaxia da leptospirose envolve a eliminação do estado de portador renal. Os roedores peridomiciliares e os silvestres, bem como os animais domésticos, podem ser portadores crônicos com infecção latente, eliminando leptospiros intermitentemente e sendo permanentes fontes de infecção para cães e humanos (HAGIWARA, MIOTTO, KOGIKA, 2015).

### **1.9.1 Imunoprofilaxia**

Anteriormente ao ano de 1960, os sorovares Icterohaemorrhagiae e Canicola eram relacionados à maioria dos casos de leptospirose no mundo (SCHULLER et al., 2015a). Porém com o advento de vacinas que garantem proteção contra esses sorovares houve uma mudança no perfil epidemiológico da doença, com diminuição gradual dos casos em cães causados por esses sorovares, e entrada no cenário de outros sorovares, principalmente Pomona, Grippotyphosa, Autumnalis e Bratislava nos Estados Unidos (GOLDSTEIN et al., 2006), Grippotyphosa e Australis na Europa (ELLIS, 2010) e Copenhageni no Brasil (KO et al., 1999; RODRIGUES et al., 2007).

No Brasil, estudos epidemiológicos e clínicos têm demonstrado a maior prevalência sorológica do sorovar Copenhageni nas infecções humanas (ROMERO BERNARDO, YASUDA, 2003; ROMERO, YASUDA, 2010). Em cães, os estudos sorológicos e de isolamento apontam a maior prevalência dos sorogrupos Canicola e Icterohemorrhagiae (YASUDA, SANTA ROSA, YANAGUITA, 1980; RODRIGUES et al., 2007).

É fortemente recomendado que os sorovares a serem incluídos nas vacinas sejam aqueles de maior importância na região e que tenham sido isolados de cães nesses locais (ARENT et al., 2013).

Foram desenvolvidas vacinas atenuadas contra leptospirose, que produzem uma imunidade mais poderosa do que as vacinas inativadas. Entretanto, em virtude de sua estabilidade contra a inativação e reversão para a virulência, as vacinas inativadas são os produtos atualmente utilizados (GREENE et al., 2015).

As vacinas disponíveis são bacterinas, ou seja, bactérias inteiras inativadas quimicamente, que induzem imunidade através da opsonização das bactérias e apresentação de antígenos de membrana (KLAASEN et al., 2003). As vacinas comercializadas no Brasil são tetravalentes (Icterohaemorrhagiae, Canicola, Pomona, Grippotyphosa) e há outras vacinas que contém o sorovar Copenhageni (NOBIVAC® DHPPI+L) (HAGIWARA, MIOTTO, TOZZI, 2015).

Os sorovares Icterohaemorrhagiae e Copenhageni pertencem ao mesmo sorogrupo, apresentando similaridade antigênica e molecular (ARIMITSU et al. 1980), e a reatividade cruzada entre ambos é evidenciada quando se incluem, na coleção de antígenos da reação SAM, os dois sorovares. Diferenças antigênicas entre os sorovares Icterohaemorrhagiae e Copenhageni foram confirmadas em ensaios que empregam conjuntos de anticorpos monoclonais (KORVER et al., 1988; HOOKEY, PALMER, 1991; RODRIGUES et al., 2012). Por serem ambos pertencentes ao mesmo sorogrupo, acredita-se que a vacina preparada com o sorovar Icterohaemorrhagiae proteja contra a infecção pelo sorovar Copenhageni, porém essa condição ainda não foi suficientemente esclarecida (HAGIWARA, MIOTTO, KOGIKA, 2015; RODRIGUES et al., 2013).

No estudo de Rodrigues et al. (2013), cães adultos com dois a seis anos de idade primo-vacinados com três doses intervaladas de 30 dias a partir dos 60 dias de idade e revacinados anualmente com vacina anti-leptospirose polivalente contendo os sorovares Canicola, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa e Pomona foram revacinados com a mesma vacina e aos 30 dias da revacinação foram submetidos aos testes de SAM e de inibição do crescimento de leptospiros *in vitro* (ICLIV), para avaliação comparativa dos níveis de anticorpos produzidos para os sorovares Canicola, Icterohaemorrhagiae e Copenhageni. A análise dos resultados encontrados após a revacinação demonstrou que cães revacinados com bacterina produzida com o sorovar Icterohaemorrhagiae não apresentam aumento do título de anticorpos inibidores do crescimento contra o sorovar Copenhageni em nível suficiente para inibir o crescimento de leptospiros. Apesar disso, os títulos de

anticorpos inibidores de crescimento anti-Copenhageni encontrados antes e após a revacinação demonstraram que, pelo menos certo grau de proteção contra a infecção por esse sorovar pode ser esperado para os cães vacinados com bacterinas do sorovar Icterohaemorrhagiae, não sendo, no entanto, uma proteção cruzada completa.

A imunidade em leptospirose canina é basicamente humoral, embora haja indícios de envolvimento de imunidade celular, sendo fortemente restrita ao sorovar homólogo, conferida pelo antígeno LPS da membrana das leptospiras (KLAASEN et al., 2003; LEVETT, 2003; GREENE et al., 2015; SONRIER et al., 2001). A duração da imunidade pós-vacinal é objeto de discussão. Estudos de desafio mostram que a proteção é completa três semanas após a série inicial de vacinas, mas quando os cães foram desafiados 27 e 56 semanas depois, observou-se leptospiremia com isolamento de leptospiras do sangue circulante (KLAASEN et al., 2003). Apesar da eficácia da vacina para proteção dos cães contra a leptospirose, ela aparentemente não impede de todo a infecção e a eliminação renal das leptospiras quando os animais são submetidos ao desafio na fase tardia do período de proteção conferido pela vacina (GREENE et al., 2015). A imunização inicial adequada, que emprega muitos dos produtos disponíveis, requer duas a três injeções, administradas em intervalos de duas a quatro semanas, iniciando com a idade mínima de nove semanas, para que haja produção da imunidade contra a infecção, que irá durar cerca de seis a oito meses, na dependência do produto e do sorogrupo. As vacinas contra leptospiroses não são recomendadas para filhotes com menos de nove semanas de idade, para reduzir a gravidade de reações de hipersensibilidade pós-vacinais (GREENE et al., 2015).

O consenso Europeu recomenda que em cães que não tenham sido vacinados há mais de 18 meses contra leptospirose reiniciem a escala básica de vacinação com administração de duas doses da vacina com intervalos de três a quatro semanas (SCHULLER et al., 2015a).

A duração da imunidade em cães após a infecção é obscura, e não se sabe se a imunidade é vitalícia, como resultado da infecção natural (SCHULLER et al., 2015a). Após a vacinação, os cães podem desenvolver anticorpos homólogos em títulos superiores a 800 ou direcionados a outros sorogrupos de leptospiras cujos

antígenos não se encontram presentes na vacina, dificultando assim a interpretação dos testes de SAM. Em um estudo, demonstrou-se que as vacinas contra os sorovares Pomona e Grippotyphosa poderiam induzir a títulos na SAM não somente contra antígenos homólogos, mas também para o sorovar Autumnalis, o que poderia conduzir a um diagnóstico errôneo de leptospirose causada pelo sorovar em questão (BARR et al., 2005).

Recentemente na Europa foi descrita uma nova vacina tetravalente contendo bacterinas dos sorovares Icterohaemorrhagiae, Canicola, Grippotyphosa e Australis que forneceu proteção em longo prazo contra o estabelecimento do estado de portador renal, controlando a infecção e excreção renal em cães 12 meses após a infecção (KLAASEN et al., 2014).

### **1.10 Considerações sobre Saúde Pública**

A leptospirose é uma zoonose de importância global, com distribuição mundial e ocorrência mais comum nas regiões de trópicos, onde as condições de transmissão são particularmente favoráveis (BARTHI et al., 2003). Em humanos, ocorre após um período de incubação de dois a 20 dias, frequentemente assemelhando-se a uma gripe leve. Uma pequena percentagem possui manifestação mais severa, com lesão hepática, renal, falência múltipla de órgãos, podendo ocasionar hemorragia pulmonar, além de aborto durante a gestação (LEVETT, 2001).

No caso de humanos, indivíduos que trabalham em abatedouros, fazendas de gado, abrigos de cães, veterinários e aqueles que têm contato direto ou indireto com roedores e animais silvestres, estão sob maior risco de adquirir a infecção ocasionada por leptospirosas patogênicas, assim como aqueles que praticam atividades recreacionais aquáticas, tais como natação, canoagem e pesca (LEVETT, 2001). Além disso, nas últimas décadas, a urbanização e as mudanças sociais tem favorecido o aumento da população canina nos países em desenvolvimento (SOUZA et al., 2002). Este aumento, associado com as relações emocionais e estreita convivência entre o homem o cão, pode constituir um grave problema de saúde pública, uma vez que os cães são capazes de transmitir uma série de zoonoses,

dentre elas a leptospirose (BERGLER, 1988; ACHA, SZYFRES, 2003; BATISTA et al., 2004).

As leptospirosas requerem condições úmidas para sua sobrevivência, e cães e outros animais infectados podem disseminar o microorganismo pela urina em coleções líquidas de qualquer natureza. Nas estações chuvosas, as inundações constituem o principal fator de risco para surtos de leptospirose em países em desenvolvimento, já que as coleções líquidas resultantes saturam o solo com leptospirosas, previnem a evaporação da urina contaminada e prolongam a sobrevivência das leptospirosas na superfície líquida. Nessas condições, podem ocorrer surtos da doença em humanos e cães (KOGIKA, MIOTTO, HAGIWARA, 2015).

A transmissão direta da infecção dos cães para os humanos não foi comprovada pelo isolamento do agente ou pela análise genética dos isolados, até o presente momento. Assim sendo, o risco exato da exposição de humanos aos cães e gatos infectados é desconhecido (BARMETTLER et al., 2011). Alguns autores sugeriram a transmissão direta da doença de cães para humanos (HAUNZ, CARDY, 1952; BARKIN, GLOSSER, 1973; FEIGIN et al., 1973), porém, no estudo recente de Barmettler et al. (2011), a soropositividade para sorovares de *Leptospiras* spp. na equipe de trabalho de um hospital escola com alta incidência de leptospirose canina e em tutores de cães com diagnóstico de leptospirose aguda foi incomum, e todas as pessoas testadas no estudo foram soronegativas para anticorpos contra sorovares de *Leptospiras* spp. Entretanto, a urina contaminada é altamente infecciosa para os seres humanos e para espécies de animais susceptíveis, devendo-se evitar qualquer contato e sendo, portanto recomendada a vacinação de cães (GREENE et al., 2015).

## 2 JUSTIFICATIVA

O município de São Bernardo do campo, com área de 409,88 km<sup>2</sup> e 827. 437 mil habitantes (IBGE, 2017), é um local considerado de risco para aquisição da doença, já que possui inúmeros bairros com condições precárias de urbanização e saneamento básico, tais como Montanhão, Ferrazópolis, Alvarenga e Valdíbia, além de possuir condições climáticas favoráveis para a manutenção da bactéria no ambiente, já que inúmeras áreas do município estão sujeitas a enchentes. A represa Billings, a qual se encontra poluída e imprópria para nado, é utilizada pela população local e por turistas como área de lazer. A Universidade Metodista, por ser uma instituição filantrópica, atende a diversos tipos de público, incluindo desde populações carentes até tutores com maior poder aquisitivo. Portanto, este trabalho atingiu as populações mais predispostas à aquisição da doença, as quais estão distribuídas nos locais de menor poder aquisitivo e com condições precárias de saneamento.

O controle da leptospirose canina em áreas urbanas é de grande interesse em Saúde Pública, principalmente devido à possível participação dos cães na cadeia epidemiológica da leptospirose humana, podendo os cães atuarem como indicadores de contaminação ambiental, alertando também quanto à introdução de um novo sorovar de importância zoonótica (BLAZIUS et al., 2005).

Sendo assim, é de fundamental importância que sejam realizados estudos para ampliar o conhecimento sobre a epidemiologia da leptospirose canina no Brasil, incluindo a predominância dos sorovares em regiões específicas, devido à ampla extensão territorial do país, para que estratégias eficazes sejam implementadas, com intuito de atingir às necessidades especiais de cada região, principalmente quanto à elaboração da vacina, para que esta seja uma ferramenta eficaz na prevenção da doença.

### **3 OBJETIVO**

Tendo em vista a importância da leptospirose canina para a Saúde Pública, o objetivo deste trabalho foi utilizar o cão com suspeita clínica de leptospirose, baseando-se na presença de lesões hepáticas e renais, para verificar quais os prováveis sorovares que mais frequentemente infectam e causam a doença no município de São Bernardo do Campo, contribuindo assim com os estudos de prevalência no Brasil.

## **4 MATERIAIS E MÉTODO**

Os procedimentos foram autorizados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNISA, parecer nº 26/2016.

A amostragem obtida foi de conveniência e o critério de inclusão baseou-se na ocorrência de lesões laboratoriais hepáticas e renais, no momento da primeira apresentação do animal no Hospital Veterinário da Universidade Metodista de São Paulo.

Foram considerados regentes ao teste de SAM os soros dos animais com titulação superior a 100, e considerou-se como o sorovar reagente àquele o qual apresentou a maior titulação.

Portanto, o critério de positividade para a doença foi a presença de soro conversão em animais não vacinados.

### **4.1 População alvo**

Foram avaliados 14 cães evidências laboratoriais de lesões hepáticas e renais, cujo diagnóstico diferencial incluía a leptospirose, com idade e raças variáveis e de ambos os sexos, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Metodista de São Paulo, localizado município de São Bernardo do Campo, SP, no período de agosto de 2016 até maio de 2017.

Coletou-se uma amostra de sangue de cada animal, no momento da apresentação deste como um novo caso clínico do Hospital.

### **4.2 Coleta dos Materiais e Exames Laboratoriais**

As amostras foram coletadas com o consentimento dos tutores de cada animal, sendo todos os procedimentos submetidos à autorização por escrito por Termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE A).

As amostras de sangue foram obtidas assepticamente por venopunção da jugular, com agulha 30x7 mm e seringa de 5 ml. Após a coleta, tais amostras foram mantidas em temperatura ambiente e posteriormente centrifugadas para a obtenção do soro, que foi aliquotado e armazenado a – 20°C até o momento de sua análise.

Os soros foram analisados por meio da técnica de soroaglutinação microscópica em campo escuro (SAM). As análises dos soros foram executadas 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 leptospiros (Quadro 1). As culturas vivas de leptospiros foram mantidas em meio líquido de EMJH modificado (ALVES, 1995), 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, obtendo-se 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 leptospiros aglutinados foi considerada como o título do soro (MYERS, 1985). As placas foram incubadas em estufa a 28-30°C por três horas e 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.

As outras alíquotas de soro foram utilizadas para a realização de exames laboratoriais complementares e análises bioquímicas, para a determinação da atividade sérica de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), gama glutamiltransferase (GGT) e dos níveis séricos de uréia, creatinina, colesterol total, triglicerídeos (TG), proteína total (PT), albumina, globulinas e bilirrubinas total (BT), direta (BD) e indireta (BI).

| 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         |
|                      | Sejroe              | Hardjo              | Hardjoprajitno  |
|                      |                     | Wolffi              | 3705            |
|                      | Shermani            | Shermani            | LT 821          |
|                      | Tarassovi           | Tarassovi           | Perepelicin     |
|                      | Djasiman            | Sentot              | Sentot          |
| <i>L.biflexa</i>     | Andamana            | Andamana            | CH 11           |
|                      | Seramanga           | Patoc               | Patoc-1         |

**Quadro 1 - Relação dos sorovares de leptospiros utilizadas como antígenos na reação de soroaglutinação microscópica aplicada ao diagnóstico de leptospirose – São Paul, 2018.**

Neste estudo, foram avaliados 10 cães com suspeita clínica de leptospirose e cujas manifestações clínicas, histórico, evolução, sorologia para a doença, bem como os valores hematológicos e bioquímicos encontrados nos exames laboratoriais, encontram-se descritos no quadro 2 e tabelas 6 e 7 abaixo. Em alguns casos, não foi possível a realização do hemograma completo e de alguns exames bioquímicos.

|                | RI    | Sexo | Idade | Raça       | Manifestações Clínicas                                                                                       | Vacinação     | SAM    | Evolução                                 |
|----------------|-------|------|-------|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|--------|------------------------------------------|
| <b>Caso 1</b>  | 42966 | F    | 5 a   | Pit bull   | Mucosas hipocoradas, apatia, desidratação, oligúria                                                          |               | NR     | AHIM<br>IRA                              |
| <b>Caso 2</b>  | 35897 | F    | 3 a   | SRD        | Icterícia, desidratação, apatia, êmese, anorexia, anúria, petéquias                                          | 0             | C 100  | IRA<br>eutanásia                         |
| <b>Caso 3</b>  | 44296 | M    | 12 a  | Daschund   | Icterícia, caquexia, crepitação pulmonar grosseira, halitose urêmica, êmese                                  | 0             | C 3200 | óbito                                    |
| <b>Caso 4</b>  | 44413 | M    | 6 m   | SRD        | êmese, anorexia, icterícia                                                                                   | 0             | B 6400 | Resolução quadro clínico após tratamento |
| <b>Caso 5</b>  | 44460 | F    | 8 m   | pinscher   | Anorexia, icterícia, êmese                                                                                   | + 6 m         | C 800  | NR                                       |
| <b>Caso 6</b>  | 44573 | M    | 9 a   | SRD        | Diarréia, êmese, anorexia, icterícia                                                                         | + 6 m         | NR     | NR                                       |
| <b>Caso 7</b>  | 31354 | M    | 7 a   | Lhasa apso | Anorexia, apatia, êmese, hipotermia, anúria, hipotensão, hipoglicemia, mucosas congestas, anorexia, Dispneia | + 6m          | NR     | óbito                                    |
| <b>Caso 8</b>  | 28893 | M    | 13 a  | poodle     | Mucosas hipocoradas, anorexia, desidratação, oligúria                                                        | 0             | NR     | eutanásia                                |
| <b>Caso 9</b>  | 43612 | F    | 6 a   | York shire | Apatia, anorexia, êmese, desidratação, dispneia, hipotermia                                                  | Há mais de 6m | NR     | DRC/ TA                                  |
| <b>Caso 10</b> | 45026 | F    | 13 a  | Pit bull   | Apatia, anorexia, hematoquezia, êmese, hipotensão, desidratação                                              | + 6 m         | NR     | EI<br>NR                                 |

**Quadro 2 – Características e principais manifestações clínicas encontradas nos 14 cães com suspeita clínica de leptospirose, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Metodista de São Paulo – São Paulo 2018**

RI\* Registro Interno

Sexo\*\* M = Macho/ F = Fêmea

Idade \*\*\* a = anos/ m = meses

SAM \*\*\*\*\* = Sorologia para Leptospirose (Titulação)/ NR = Não reagente/ C= Copenhageni/ B= Bratislava

Evolução: NR = não retornou/ EI = Encaminhado internação/ DRC = Doença Renal Crônica/ TA = Tratamento Ambulatorial/AHIM = Anemia Hemolítica Imune Mediada/ IRA = Insuficiência Renal Aguda

**Tabela 6 – Parâmetros hematológicos encontrados nos 10 cães com suspeita clínica de leptospirose, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Metodista de São Paulo – São Paulo 2018**

| Parâmetros                   | Referência                    | Caso Clínico número |        |        |        |        |        |       |       |       |        |
|------------------------------|-------------------------------|---------------------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|--------|
|                              |                               | 1                   | 2      | 3      | 4      | 5      | 6      | 7     | 8     | 9     | 10     |
| Hemácias                     | 5,7 – 7,4 x10 <sup>6</sup> µl | 3,44                |        |        | 7,03   | 6,36   | 7,07   | 7,53  | 7.82  |       | 6,11   |
| Hemoglobina                  | 14 - 18g/dl                   | 7,7                 |        |        | 17,7   | 14,4   | 15,1   | 17    | 18,8  |       | 12,7   |
| Hematócrito                  | 37- 47%                       | 26                  | 31     | 42     | 54     | 43     | 49     | 48    | 51    | 52    | 38     |
| VCM <sup>1</sup>             | 60-77/ µm <sup>3</sup>        | 75,6                |        |        | 76,8   | 67,6   | 69,3   | 63,7  | 65,2  |       | 62,2   |
| CHCM <sup>1</sup>            | 2 – 36%                       | 29,6                |        |        | 32,8   | 33,5   | 30,8   | 35,4  | 36,9  |       | 33,4   |
| Proteína total plasmática    | 5,5 -8g/dl                    | 8,2                 | 5.2    | 10,4   | 8,2    | 7,6    | 7,8    | 6,8   | 8,4   | 8,4   | 10,8   |
| Leucócitos x 10 <sup>3</sup> | 6 - 17x10 <sup>3</sup> /µl    | 4,5*                | 23*    | 64,1*  | 32,8*  | 19,6*  | 16,5*  | 11,2* | 10,7* | 11,2* | 44*    |
| Eosinófilos                  | 150 - 1350/µl                 | 0                   |        | 0      | 656    | 0      | 0      | 0     | 321   | 0     | 0      |
| Metamielócitos               | 0/µl                          | 0                   |        | 0      | 0      | 0      | 0      | 0     | 0     | 0     | 0      |
| Bastonetes                   | 0 - 300/µl                    | 0                   |        | 641    | 984    | 0      | 0      | 1792  | 107   | 0     | 0      |
| Segmentados                  | 3 - 11,5 mil/µl               | 3.195               | 20.240 | 55.126 | 25.584 | 15.288 | 15.345 | 7.504 | 8.239 | 9.296 | 3.5640 |
| Linfócitos                   | 1 - 4,8 mil/µl                | 0                   | 1.150  | 2.564  | 2.952  | 2.352  | 495    | 1.456 | 963   | 0     | 1.760  |
| Bastonetes                   | 0/µl                          | 0                   | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0     | 0     | 0     | 0      |
| Monócitos                    | 150 - 1.350/µl                | 4.500               | 1.610  | 5.769  | 2624   | 1960   | 660    | 336   | 1070  | 1568  | 6600   |
| Plaquetas                    | 200 – 500 mil/mm <sup>3</sup> | 105                 | 40     | 210    | 209    | 189    | 143    | 136   | 265   | 360   | 116    |

VCM<sup>1</sup> = Volume Corpuscular Médio

CHCM<sup>2</sup> = Concentração Hemoglobina Média

\* = x 10<sup>3</sup> = multiplicado por mil

**Tabela 7 – Parâmetros bioquímicos encontrados nos 14 cães com suspeita clínica de leptospirose atendidos no hospital Veterinário da Universidade Metodista de São Paulo.**

|           | Parâmetro |                    |                  |                  |                 |                  |                 |                  |                 |                   |                 |                 |                  |                  |                  |
|-----------|-----------|--------------------|------------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|-------------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|
|           | Ur        | Creat <sup>2</sup> | ALT <sup>3</sup> | Alb <sup>4</sup> | FA <sup>5</sup> | GGT <sup>6</sup> | PT <sup>7</sup> | AST <sup>8</sup> | TG <sup>9</sup> | Col <sup>10</sup> | K <sup>11</sup> | P <sup>12</sup> | BT <sup>13</sup> | BD <sup>14</sup> | BI <sup>15</sup> |
| <b>1</b>  | 216,8     | 1,6                |                  | 2,9              | 802,7           | 59,5             |                 |                  | 54,4            | 259,7             |                 |                 | 0,73             | 0,28             | 0,45             |
| <b>2</b>  | 255,1     | 6,9                | 817              | 2,4              | 2448            | 13               | 6,11            | 780,5            | 39,12           | 97,9              |                 |                 | 23,6             | 15,48            | 8,12             |
| <b>3</b>  | 771,4     | 5,2                | 215,8            | 2,2              | 2130            | 68,6             | 8,6             | 134              | 1475            | 172               |                 |                 | 28,26            | 20,43            | 7,73             |
| <b>4</b>  | 143,3     | 2,0                | 576,2            | 3,7              | 1472,6          | 46,4             | 8,1             | 221              | 50,8            | 146,5             |                 |                 | 21,44            | 15,1             | 6,34             |
| <b>5</b>  | 382,6     | 5,9                | 249,3            | 2,9              | 1940,4          | 26,8             | 6,8             | 98,5             | 53,2            | 134,6             | 4,5             |                 | 23,36            | 18,58            | 4,78             |
| <b>6</b>  | 108,7     | 3,1                | 607,6            | 2,7              | 1728            | 32,8             | 7,5             | 352              | 35,5            | 158,6             | 3,9             |                 | 8,24             | 6,24             | 2,0              |
| <b>7</b>  | 216,1     | 3,6                | 41,9             | 1,9              | 389,7           | 15,3             |                 | 45,4             | 1313            | 306               | 2,8             |                 | 1,62             | 1,32             | 0,30             |
| <b>8</b>  | 173,4     | 3,9                | 102,7            | 2,4              | 960,2           | 46,5             | 5,8             | 62,9             | 84,7            | 297,1             | 6,5             |                 | 0,75             | 0,24             | 0,51             |
| <b>9</b>  | 598,7     | 8,0                | 55,5             | 2,29             |                 | 3,5              | 6,87            | 108,3            | 159,7           | 503,78            | 7,3             | 46,4            | 0,97             | 0,26             | 0,71             |
| <b>10</b> | 300,2     | 4,9                | 47,1             | 1,9              | 298,5           | 7,6              | 8,8             | 69,8             | 121,7           | 461,8             | 4,3             | 21,3            | 0,32             | 0,03             | 0,29             |

Ur<sup>1</sup> = Uréia (referência: 7-32 mg/dl)

Creat<sup>2</sup> = Creatinina (referência: 0,5 -1,4 mg/dl)

ALT<sup>3</sup> = Alanina Aminotransferase (referência: 10-94 UI/L)

Alb<sup>4</sup> = Albumina (referência: 2,5 – 4,0 g/dl)  
FA<sup>5</sup> = Fosfatase Alcalina (referência: 0-180 UI/L)  
GGT<sup>6</sup> = Gama Glutamiltransferase (referência 1-10 UI/L)  
PT<sup>7</sup> = Proteína Total (referência: 5,7-7,7 mg/dl)  
AST<sup>8</sup> = Aspartato Aminotransferase (referência: 10-62 UI/L)  
TG<sup>9</sup> = Triglicérides (referência:50-100 mg/dl)  
Col<sup>10</sup> = Colesterol (referência:100-300 g/dL)  
K<sup>11</sup> = Potássio (referência:3,9-5,5 mEq/L)  
P<sup>12</sup> = Fósforo (referência:2,6-6,2 mg/dl)  
BT<sup>13</sup> = Bilirrubina Total (referência:0,1-0,6 g/dl)  
BD<sup>14</sup> = Bilirrubina Direta (referência:0,1 – 0,3 g/dl)  
BI<sup>15</sup> = Bilirrubina Indireta (referência:0- 0,3 g/dl)

## 6 DISCUSSÃO

Neste trabalho, foram avaliados 10 casos suspeitos de leptospirose. Dentre estes, quatro confirmaram-se positivos: os casos 2, 3, 4 e 5, ou seja, uma frequência de 40% de positividade. Dentre os positivos, o provável sorovar mais prevalente foi o Copenhageni, representando 75% dos casos. É interessante notar que um dos casos foi positivo para o sorovar Bratislava (caso 4), cujo antígeno não está presente na vacina. A maior frequência de reagentes ao sorovar Copenhageni possivelmente relaciona-se às condições ambientais, ausência de vacinação e exposição dos cães aos roedores em épocas mais chuvosas. Apesar de não se conhecer ao certo a duração da imunidade conferida pela vacina, na maior parte dos casos, o título de anticorpos torna-se nulo em três a nove meses após a vacinação (HAGIWARA, LUSTOSA, KOGIKA, 2004). Portanto, considera-se que não houve interferência de anticorpos vacinais nos casos positivos, já que os casos 2 e 3 nunca haviam sido vacinados, e os casos 4 e 5 haviam sido vacinados há mais de 6 meses.

Conforme cita a literatura, acredita-se que a vacina preparada com o sorovar Icterohaemorrhagiae proteja contra a infecção pelo sorovar Copenhageni, por serem ambos pertencentes ao mesmo sorogrupo, porém essa condição ainda não foi suficientemente esclarecida (HAGIWARA, MIOTTO, KOGIKA, 2015; RODRIGUES et al., 2013). Este dado não foi passível de avaliação neste trabalho, pois todos os animais positivos avaliados estavam com vacinação desatualizada ou não haviam sido vacinados conforme recomendação.

Neste estudo, o provável sorovar mais frequente nos cães doentes foi o Copenhageni, assim como cita a literatura como sendo o provável sorovar mais frequente nos casos de doenças em cães no Brasil (CORDEIRO, SULZER, 1983; RODRIGUEZ et al, 2007; FRAGA, 2008). Observou-se maior prevalência em filhotes (50% dos cães positivos) que à citada em literatura (20,5%) (MAJOR et al., 2014), devido a esta fase ser de superexposição ambiental referente ao período de socialização e pela ausência de vacinação, nos casos em questão. Quanto à predisposição sexual e racial, não houve prevalência por determinado sexo ou raça, já que 50% dos casos positivos foram fêmeas, 50% machos e 50% não apresentavam raça definida, diferentemente do que cita a literatura, que cães

machos, não vacinados, com idade entre 4 a 10 anos, cães de trabalho, pastoreio, caça e sem raça definida, quando comparados a cães de companhia são mais predispostos (LEE et al., 2014).

Quanto às alterações hemostáticas, observou-se moderada trombocitopenia no caso 2, conforme citam Schuller et al. (2015a), e discreta anemia, conforme citam Hagiwara, Miotto e Kogika (2015). Neste estudo, a desordem hematológica mais comum encontrada foi leucocitose, ocorrendo em 100% dos casos positivos, assim como no estudo de Wolffebbüttel et al. (2004) e Geisen et al. (2007). Assim sendo, anemia foi observada em 25% dos casos positivos, leucocitose com neutrofilia em 100% dos casos e trombocitopenia, único parâmetro hemostático avaliado, em 50% dos casos positivos.

Quanto aos achados bioquímicos, um dado interessante a ser avaliado, seria a concentração sérica da enzima muscular CPK, já que no estudo de Wolffebbüttel et al. (2004), 71% dos animais apresentavam aumento da mesma. No trabalho de Mastrorilli et al. (2007) observou-se aumento de CPK em 44 a 69% dos pacientes positivos para leptospirose, e em humanos a taxa de aumento da enzima foi superior a 50%. Neste estudo, também se observou aumento de troponina I, dado condizente com lesão miocárdica. Portanto, seria interessante um estudo contendo tais enzimas para verificar se há indícios de lesão muscular e miocárdica na leptospirose em cães.

Em comparação ao estudo de Wolffebbüttel et al. (2004), os índices de azotemia, hipoalbuminemia e as elevações nas concentrações séricas de ALT, AST, FA encontrados nos animais positivos deste estudo foram maiores, já que observou-se azotemia e elevações das enzimas hepáticas em 100% dos casos e hipoalbuminemia em 50% dos casos. Já no estudo de Wolffebbüttel et al. (2004), os índices respectivos foram de 85,7%, 28%, 71% e 43%. Assim sendo, observou-se diferença marcante da elevação das enzimas hepáticas neste estudo. Quanto às concentrações séricas de BT, BD, os índices foram os mesmos encontrados em ambos os trabalhos, apresentando CPK não foram avaliadas nos animais deste estudo, para comparação com o trabalho de Wolffebbüttel et al. (2004). No trabalho de Freire, Vargas e Lilenbaum (2008), também não houve diferença estatística significativa nas elevações das enzimas ALT e AST.

Assim como relatado por Hagiwara, Miotto e Kogika (2015), todos os cães com leptospirose apresentaram azotemia. Portanto, os cães com leptospirose deste estudo apresentaram severa doença renal e hepática também, com índice de lesão hepática e colestase, maiores que os encontrados na literatura.

Quanto ao teste de SAM, os dados obtidos neste trabalho estão de acordo com os dados observados na literatura, de que o sorovar Copenhageni é possivelmente o mais prevalente observado em cães e humanos no Brasil (HAGIWARA, MIOTTO, KOGIKA, 2015; RODRIGUES et al. 2012; KO et al., 1999), já que anticorpos contra este sorovar estavam presentes em maior titulação em 75% dos animais positivos.

Os casos 3 e 4 apresentaram titulação superior à 1.600, referentes aos sorovares Copenhageni e Bratislava, respectivamente, sugerindo infecção aguda e atual, de acordo conforme citam Sykes et al. (2011). Não houve interferência dos anticorpos vacinais na interpretação deste resultado, uma vez que ambos não possuíam histórico vacinal. De acordo com Hagiwara, Miotto e Kogika (2015), as vacinas tetravalentes podem resultar na formação de anticorpos reagentes aos antígenos vacinais e também a antígenos do sorogrupo Bratislava e Autumnalis, que não estão inclusos na vacina.

No animal do caso 2, observou-se baixa titulação para o sorovar Copenhageni, porém observou-se uma grave doença clínica, com importante comprometimento hepático e renal, de caráter agudo. Além disso, tal animal apresenta histórico de roedor há 15 dias. Assim sendo, possivelmente devido ao caráter muito agudo e recente da infecção, não houve tempo para desenvolvimento de altos títulos de IgM, corroborando para a baixa sensibilidade para diagnóstico precoce através do SAM, conforme descrevem Fraune, Schweighauser e Francey (2013). No caso em questão, o animal apresentou grave comprometimento hepático e renal, evoluindo rapidamente para insuficiência renal aguda, sem resposta ao tratamento clínico para reversão da anúria, com a utilização de diuréticos de alça (furosemda) e vasodilatadores (infusão contínua de dopamina na dose de 5 mcg/kg/minuto). A antibioticoterapia com doxiciclina foi instituída no momento da admissão do animal no Hospital Veterinário, na dose de 5 mg/kg a cada 12 horas, devido a forte suspeita clínica de leptospirose e histórico recente de ingestão de

roedor. O animal também apresentou distúrbios hemorrágicos, com manifestações de hematoquezia, hematoêmese, petéquias, apresentando grave trombocitopenia. Por tais motivos, realizou-se transfusão de plasma, administração de vitamina K, ácido tranexâmico na dose de 10 mg/kg a cada 8 horas via subcutânea, e tratamento com heparina na dose de 100 UI/Kg via subcutânea a cada 8 horas, devido à suspeita de Coagulação Intravascular disseminada. Realizou-se também tratamento para os distúrbios gastrointestinais, com administração de citrato de maropitant na dose de 1mg/kg via subcutânea a cada 24 horas, omeprazol na dose de 1mg/kg e sucralfato na dose de 30 mg/kg via oral a cada 12 horas. Apesar de todos os esforços clínicos, o animal não restituiu a função urinária e a tutora optou por realização de eutanásia, após 48 horas de persistência da anúria. Clinicamente, o diagnóstico era altamente sugestivo de leptospirose, com síndrome hepática e renal aguda grave instituída. Porém, a baixa titulação de anticorpos contra o sorovar Copenhageni encontrado no exame de SAM pode ser decorrente do caráter muito agudo da infecção e da utilização precoce do antibiótico, no momento da aquisição do animal no Hospital.

Já o caso do animal 11, o qual apresentou titulação negativa, pode tratar-se de um falso – negativo decorrente de quadros muito agudos, já que o mesmo apresentou quadro urêmico, hepático e séptico agudo e grave, inclusive com manifestações pulmonares, evoluindo rapidamente para o óbito. O animal deu entrada no Hospital em caráter emergencial, em quadro grave de choque séptico. Havia histórico clínico de possibilidade de contato com roedor e vacinação desatualizada, há mais de seis meses. Ao exame físico inicial, o animal apresentou-se hipotenso, com pulso femoral fraco, hipotermia (temperatura corpórea de 36,4 °C), mucosas congestas, intensa dificuldade respiratória com presença de estertores úmidos e crepitação pulmonar grosseira à auscultação, taquipnéia, taquicardia, hipoglicemia (concentração de glicose sérica de 59 mg/dl), hiperlactatemia (concentração séria de lactato de 3,7 mmol/L), condizente com comprometimento da perfusão tecidual, além de diminuição do débito urinário. No hemograma constatou-se desvio à esquerda e presença de leucócitos tóxicos (classificação ++-), linfócitos reativos (1%) e trombocitopenia. Nos bioquímicos, observou-se presença de azotemia, elevação das concentrações séricas de FA, hiperlipidemia e hiperbilirrubinemia. Institui-se fluidoterapia intravenosa com choque de carga,

utilização de vasodilatadores para restituição da pressão artéria sanguínea (dobutamina na dose de 10 mcg/kg/min), antibioticoterapia de amplo espectro, utilizando-se a associação de ceftriaxona na dose de 30 mg/kg a cada 12 horas e metronidazol na dose de 30 mg/kg a cada 24 horas, por via intravenosa, além de tentativa de reversão da oligúria com furosemida na dose de 2 mg/kg via intravenosa e utilização de protetores gástricos, antieméticos, administração de glicose *in bolus* e tratamento profilático para dor. Após 8 horas de tratamento, o animal apresentou óbito. Realizou-se exame necroscópico e observou-se comprometimento hemorrágico pulmonar.

O caso número 3, positivo ao teste de SAM, com titulação de 3.200 para o sorovar Copenhageni, foi admitido no hospital com queixa principal de apatia e anorexia há quatro dias, com primo atendimento em outro estabelecimento veterinário, e instituição de fluidoterapia e tratamento sintomático para distúrbios gastrointestinais e dor. No momento da aquisição como caso novo no hospital, a tutora referiu que o animal apresentava dificuldade respiratória há um dia. Ao exame físico o animal apresentava mucosas congestas, decúbito lateral e desidratação de 7%. Procedeu-se coleta de sangue, tratamento sintomático para distúrbios gastrointestinais, tratamento profilático para dor e antibioticoterapia com amoxicilina na dose de 22mg/kg VO a cada 12 horas. Solicitou-se ultrassonografia abdominal, radiografia torácica e ecocardiograma. Após dois dias, o animal retornou ao hospital em quadro urgencial, apresentando taquipnéia, mucosas e peles ictericas, desidratação moderada, halitose urêmica, doença periodontal severa, caquexia, dispnéia expiratória, e, à ausculta cardiopulmonar, presença de crepitação pulmonar grosseira em lobos pulmonares caudais e sopro grau II/VI sistólico, foco em mitral. O débito urinário encontra-se dentro da normalidade, sendo superior a 2 ml/kg/minuto. Constatou-se hiperlactatemia (concentração sérica de lactato no valor de 5,1 mmol/L), fato condizente hipóxia tecidual, e pressão arterial sistólica do valor de 100 mmHg. Institui-se oxigenioterapia, fluidoterapia e antibioticoterapia sistêmica. Coletou-se amostra sanguínea para realização de hemograma, exames bioquímicos complementares e SAM. Observou-se importante leucocitose, azotemia e presença de lesão hepática. Foi solicitado internação em hospital 24 horas durante o período noturno, local onde animal apresentou óbito. O animal estava com a tutora há dois anos, e a mesma nunca o havia vacinado, não sabendo informar sobre o histórico

anterior de vacinação. No animal em questão não foi realizado exame necroscópico, o que seria interessante para averiguar se o mesmo apresentava manifestações de hemorragia pulmonar, devido ao quadro clínico de comprometimento pulmonar.

O animal do caso número 3 apresentou anticorpos contra o sorovar Bratislava, ao teste de SAM, com a titulação de 6.400, sendo o maior título de anticorpos observados nos animais positivos ao teste de SAM deste estudo. Contudo, apesar da alta titulação, tal animal era o que apresentava a melhor condição clínica. O histórico incluía anorexia, apatia e icterícia há cinco dias, aquezia há 3 dias, episódios de êmese com resolução espontânea por 2 dias. A imunização encontrava-se desatualizada e a tutora referia contato com roedores. Ao exame físico, animal apresentava-se desidratado (7%), com pele e mucosas ictéricas, aspecto geral normal, responsivo a estímulos e com comportamento dócil, característico de filhotes. Realizou-se coleta de exames e tratamento sintomático para os distúrbios gastrointestinais, instituição de fluidoterapia para correção da desidratação e antibioticoterapia por via oral com doxiciclina na dose de 5 mg/kg a cada 12 horas, além de estimulante de apetite e dieta hipercalórica. A tutora em questão possuía condições financeiras restritas, sendo assim todo tratamento medicamentoso prescrito ao animal foi doado através de contribuições de outros tutores para o Hospital Veterinário. O animal não retornou ao Hospital para continuidade do tratamento, conforme solicitado. Porém, após contato telefônico, 10 dias após o início do tratamento, a tutora informou que o animal encontrava-se em ótimo estado geral, com resolução da anorexia, apatia e icterícia.

O animal do caso 5 confirmou-se positivo para leptospirose ao teste de SAM, com titulação de 800 para o sorovar Copenhageni. No momento da admissão no Hospital, a tutora referiu anorexia, êmese há quatro dias e imunização há mais de 6 meses. Ao exame físico observou-se desidratação (5%) e mucosas ictéricas. Através de exames bioquímicos constatou-se comprometimento da função hepática e renal, além de leucocitose com presença de neutrofilia, hiperproteinemia plasmática e trombocitopenia leve. Institui-se antibioticoterapia com doxiciclina na dose de 5 mg/kg a cada 12 horas e fluidoterapia, e após dois dias de tratamento, animal não compareceu aos retornos, conforme orientação. Após 10 dias da admissão, via contato telefônico, a tutora informou que o animal encontrava-se em bom estado geral.

O paciente do caso 1 foi admitido no hospital com quadro de pancitopenia, comprometimento da função renal e hepática. Por tal motivo, considerou-se leptospirose como um diagnóstico diferencial, contudo não houve títulos de anticorpos após a realização de SAM. Nos exames subsequentes, o animal desenvolveu grave anemia com presença de esferócitos, sendo necessária a realização de transfusão sanguínea. O diagnóstico instituído foi de anemia hemolítica imunomediada, sendo realizado tratamento imunossupressor com prednisolona na dose inicial de 2 mg/kg a cada 12 horas, e solicitado sorologia com titulação para Erlichiose e Babesiose, além de Imunofluorescência indireta para leishmaniose. Entretanto, tais exames não foram realizados pelos tutores e os mesmos optaram por descontinuar o tratamento, devido a limitações financeiras.

No animal do caso 6, havia suspeita de leptospirose devido ao comprometimento renal e hepático. O tutor referia anorexia, êmese e diarreia há 2 dias. Porém, após o primo atendimento, o animal não compareceu aos retornos e o teste de SAM não foi positivo. Entretanto, devido à suspeita clínica de leptospirose, institui-se tratamento com doxiciclina, protetores hepáticos e gástricos.

Já no caso 8 havia suspeita inicial de leptospirose devido ao comprometimento hepático e renal, contudo, após exame ultrassonográfico, constatou-se hidronefrose e importante espessamento uretral, sendo por este motivo animal submetido à laparotomia exploratória, através da qual se coletou amostras de tecidos uretrais e renais para exame histopatológico, concluindo-se o diagnóstico de carcinoma urotelial. O animal apresentou óbito cinco dias após o procedimento cirúrgico.

O caso clínico 9 apresentava apatia, anorexia, êmese, diarreia e histórico de contato com roedores, além de imunização desatualizada. Sendo assim, considerou-se leptospirose como um dos diagnósticos diferenciais. Ao exame físico o animal apresentava desidratação severa, dilatação gástrica por ar e bexiga com moderada repleção, hiperventilação respiratória, hipotermia, halitose urêmica, úlceras gengivais, alteração de consciência, tremores e decúbito lateral. A sorologia foi negativa, contudo observou-se importante síndrome urêmica, com presença de encefalopatia urêmica e acentuada hiperfosfatemia, além de hiperproteinemia plasmática, policitemia, elevação da concentração sérica de AST, hipoalbuminemia,

hipercalcemia, hiperfosfatemia, hiperlipidemia e infecção de trato urinário. Realizou-se tratamento ambulatorial urgencial, com aquecimento, oxigenioterapia, correção de distúrbios hídricos e eletrolíticos, protetores de mucosa gastrointestinal e antieméticos, opióides para controle da dor, quelante de fósforo (hidróxido de alumínio na dose de 30 mg/kg juntamente com a alimentação), diazepam para controle dos tremores decorrentes da encefalopatia urêmica, antibioticoterapia com amoxicilina na dose de 22 mg/kg a cada 12 horas, devido à infecção urinária e gengivite e insulina regular associada à glicose *in bolus* para controle da hipercalcemia, nas doses respectivas de 0,2 UI/kg e 2g de glicose por UI de insulina administrada, e nutrição enteral, após estabilização do quadro clínico. Institui-se o diagnóstico de Doença renal Crônica estágio IV. O animal continuou em tratamento suporte no Hospital.

Por fim, o caso clínico 10 foi admitido no hospital com queixa de hematúria, colúria, anorexia e êmese. Ao exame físico animal apresentou-se moderadamente desidratado. Observou-se leucocitose moderada, importante hiperproteinemia plasmática e trombocitopenia ao hemograma. Nos exames bioquímicos constatou-se azotemia, elevação da concentração sérica de FA e AST, hipoalbuminemia e hiperproteinemia sérica, hiperlipidemia e importante hiperfosfatemia. Realizou-se tratamento suporte, com correção dos desequilíbrios hídricos e eletrolíticos, tratamento dos distúrbios gastrointestinais, antibioticoterapia com amoxicilina na dose de 22 mg/kg a cada 8 horas, quelante de fósforo, hepatoprotetores e solicitou-se internação devido à gravidade do caso. Porém, o animal não retornou ao serviço de atendimento.

## 7 CONCLUSÃO

Os achados clínico-laboratoriais encontrados nos cães do presente estudo, com resposta sorológica à leptospirose mostraram um comprometimento renal e hepático severo, evidenciado por indicadores sanguíneos e manifestações clínicas.

Portanto, este trabalho foi importante para determinar o quadro clínico predominante na região, para determinar que o provável sorovar mais prevalente no município de São Bernardo do Campo é o Copenhageni, e para atentar que o sorovar Bratislava, que não está presente na vacina, pode estar causando doença clínica na região. Porém seriam necessários mais estudos para comprovar a prevalência deste último sorovar, além de estudos para determinar a presença deste sorovar em reservatórios, tais como bovinos e suínos da região, a fim de determinar a importância ou não da inclusão deste sorovar na vacinação.

Com base neste resultado, pode-se concluir que a exposição ao sorovar Bratislava em cães nesta região deve ser monitorada, pois os cães podem servir como sentinelas para tal sorovar neste ambiente específico. Apesar de o provável sorovar infectante ser o Bratislava no caso clínico número 4, com a mais alta titulação de anticorpos encontrada neste estudo, a cultura e isolamento não foram realizadas, o que confirmaria o diagnóstico. Tais procedimentos seriam extrema importância e contribuição para a ciência, já que tal sorovar nunca foi isolado de cães. Vale ressaltar que apesar da titulação mais alta observada ao teste de SAM neste estudo, o animal era o que melhor apresentava-se clinicamente, podendo sugerir uma baixa patogenicidade do sorovar em questão.

## 8 REFERÊNCIAS

ABDOEL, T. H.; HOUWERS, D.J.; van DONGEN, A.M.; ADESIYUN, A.A.; JIMENÉZ-COELLOE, M.; CARDOSO, L.; SUEPAUL, S.M.; ORTEGA-PACHECO, A. SMITS, H.L. Rapid test for the serodiagnosis of acute canine leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 150, p. 211–213, 2011.

ACHA, Pedro N.; SZYFRES Boris. Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales. **Organizacion Panamericana de La Salud**, Washington, 2003, publicação Científica, 580 p.

ADAMUS, C., BUGGIN-DAUBIÉ; IZEMBART, A.; SONRIER-PIERRE, C.; MASSON, M.T.; ANDRÉ-FONTAINE, G.; WYERS, M. Chronic hepatitis associated with leptospiral infection in vaccinated beagles. **J. Comp. Pathol.**, v. 117, n.4, p. 311-28, nov. 1997.

ADIN, C.A.; COWGILL, L.D. Treatment and outcome of dogs with leptospirosis: 36 cases (1990-1998). **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.216, n.3, p. 371-5, 2000.

ADLER, Ben. **Leptospira and Leptospirosis**. 1ª Ed. Austrália: Springer, 2015. 295p.

ADLER, Ben; MOCTEZUMA, Alejandro de la P. Leptospira and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 140, n.3-4, p.287–296, jan. 2010.

AGUIAR, Daniel M.; CAVALVANTE, G.T.; MARVULO, M.F.V., SILVA, J.C.R., PINTER, A.; VAS, S.A. Fatores de risco associados à ocorrência de anticorpos anti-Leptospira spp. em cães do município de Monte Negro, Rondônia, Amazônia Ocidental Brasileira. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.59, n.1, p.70-76, 2007.

AGUIAR, Daniel M.; GENNARI, S.M.; CAVALCANTE, T.G.; LABRUNA, M.B.; VASCONCELLOS, S.A.; RODRIGUES, A.A.R.; MORAES, Z.M.; CAMARGO, L.M.A. Seroprevalence of *Leptospira* spp. in cattle from Monte Negro municipality, western Amazon. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.26, n.2, p.102-104, 2006.

AHMED, N.; DEVI, S.M.; VALVERDE, M.D.A.; VIJAYACHARI, P.; MACHANG'U, R.S.; ELLIS, W.A.; HARTSKEERL, R.A. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**. v.5, n.28, p. 1-10, nov. 2006.

ALEXANDER, A.D.; RULE, P.L. Penicillins, cephalosporins, and tetracyclines in treatment of hamsters with fatal leptospirosis. **Antimicrob Agents Chemother**, v.30, n.6, p.835-9, 1986.

ALVES, C. J.; VASCONCELLOS, S. A.; CAMARGO, C. R. A.; MORAIS, Z. M. Influência de fatores ambientais na proporção de caprinos soro-reagentes para a leptospirose em cinco centros de criação do Estado da Paraíba. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 63, n. 2, p. 11-18, 1995.

ARENT, Z.J.; ANDREWS, S.; ADAMAMA-MORAITOU, K.; GILMORE, C.PARDALI, D., ELLIS, W.A. Emergence of novel *Leptospira* serovars: a need for adjusting vaccination policies for dogs? **Epidemiol. Infect.**, v. 141, p. 1148–1153, 2013.

ARIMITSU, Y.; MORI, M.; AKAMA, K. Cross antigenicities of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni Shibaura strain for preparing biological products in Japan. **Jap. J. Med. Sci. Biol.**, v. 33, p. 223-229, 1980.

AZEVEDO, S.S; FERNANDES, A.R.F.; QUEIROGA, I.M.B.N.; ALVES, C.J.; MORAIS, Z.M.; SANTOS, C.S.A.B.; VASCONCELLOS, S.A. Ocorrência e fatores de risco associados à leptospirose em cães atendidos em Hospital Veterinário no Semiárido Paraibano. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 48, n. 2, p. 161-166, 2011.

BAL, A.E.; GRAVEKAMP, C.; HARTSKEERL, R.A.; DE MEZA-BREWSTER, H.K.; TERPSTRA, W.J. Detection of Leptospirosis in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n.8, p.1894-1898, 1994.

BANDEIRA, M.; SANTOS, C.S.; DE AZEVEDO, E.C.; SOARES, L.M.; MACEDO, J.O.; MARCHI, S.; DA SILVA, C.L.R.; CHAGAS-JUNIOR, A.D.; McBRIDE, F.W.C.; REIS, M.G.; ATHANAZIO, D.A. Attenuated nephritis in inducible nitric oxide synthase knockout C57BL/6 mice and pulmonary hemorrhage in CB17 SCID and recombination activating gene 1 knockout C57BL/6 mice infected with *Leptospira interrogans*. **Infect. Immun.**, v.79, n.7, p.2936-40, 2011.

BARBOSA, Angela S.; ABREU, P.A.E.; VASCONCELLOS, S.A.; MORAIS, Z.M.; GONÇALES, A.P.; SILVA, A.S.; DAHA, M.R.; ISAAC L. Immune Evasion of *Leptospira* Species by Acquisition of Human Complement Regulator C4BP. **Infection and Immunity**, v.77, n.3, p. 1137-1143, mar. 2009.

BARCELLOS, C.; QUITÉRIO, L. A. A. Vigilância ambiental em saúde e sua implantação no Sistema único de Saúde. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.40, n.1, p.170-171, 2006.

BARKIN, R.M.; GLOSSER, J.W. Leptospirosis an epidemic in children. **Am J Epidemiol.**, v.98, n.3, p. 184-91, 1973.

BARMETTLER, R. ; SCHWEIGHAUSER, A.; BIGLER, S.; GROOTERS, A.M.; FRANCEY, T. Assessment of exposure to *Leptospira* serovars in veterinary staff and dog owners in contact with infected dogs. **J Am Vet Med Assoc.** , v.238, n. 2, p. 183-8, 2011.

BARTHÉLEMY, A.; MAGNIN, M.; POUZOT-NEVORET, J.M.; BONNET-GARIN, J.M.; HUGONNARD, M.; THOLLOT, G.I. Hemorrhagic, Hemostatic, and Thromboelastometric Disorders in 35 Dogs with a Clinical Diagnosis of Leptospirosis: A Prospective Study. **J Vet Intern**, v. 31, n.1, p. 69-80, jan 2017.

BARNETT, Jeanne K.; BARNETT, D.; BOLIN, C.A.; SUMMERS, T.A.; WAGAR, E.A.; CHEVILLE, N.F.; HARTSKEERL, R.A.; HAAKE, D.A. Expression and Distribution of Leptospiral Outer Membrane Components during Renal Infection of Hamsters. **Infection and Immunity**, v.67, n.2, p. 853-61, fev. 1999.

BARR, S.C.; McDONOUGH, P.L.; SCIPIONI-BALL, R.L.; STARR, J.K. Serologic responses of dogs given a commercial vaccine against *Leptospira interrogans* serovar pomona and *Leptospira kirschneri* serovar Grippotyphosa. **Am J Vet Res.**, v.66, n.10, p. 1780-4, 2005.

BARTHI, A. J.; NALLY, J.A.; RICARDI, J.N.; MATTHIAS, M.A.; DIAZ, M.A.; LOVETT, M.A.; LEVETT, P.N.; GILMAN, R.H.; WILLIG, M.R.; GOTUXOXO, E.; VINETZ, J.M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Infectious Disease**, v. 3, p. 757-771, dez. 2003.

BATISTA, Carolina; AZEVEDO, S.S.; ALVES, C.J.; MORAIS, Z.M.; CLEMENTINO, I.J.; LIMA, F.S.; NETO, J.O.A. Soroprevalência de leptospirose em cães errantes da cidade de Patos, Estado da Paraíba, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 41, n. 2, p. 131-136, 2004.

BAUMANN, D.; FLUCKIGER, M. Radiographic findings in the thorax of dogs with leptospiral infection. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v.42, n.4, p. 305-307, 2001.

BENITEZ, A. N.; GONÇALVES, D.D.; FREIRE, R.L.; RODRIGUES, W.B.; DE SOUZA, V.R.A.; BARBARA, J.C.A.; DE FREITAS, J.C. Soroepidemiologia da leptospirose em cães domiciliados na área urbana do município de Jataizinho, Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.33, n.2, p. 3201-10, 2012.

BEPA 2012. **Leptospirose no Estado de São Paulo, 2007 a 2011**, v. 9, n. 107, p. 5-11, 2012.

BERGLER, Reinhold. Man and dog: the psychology of a relationship. **Blackwell Scientific Publications**, Boston, p. 188, 1988.

BIER, D. ; SHIMAKURA, S.E.; MORIKAWA, V.M.; ULLMANN, L.S.; KIKUTI, M.; LANGONI, H.; BIONDO, A.W.; MOLENTO, M.B. Análise espacial do risco de leptospirose canina na Vila Pantanal, Curitiba, Paraná. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v.33, n.1, p. 74-79, janeiro 2013.

BISHOP, L.; STRANDBERG, J.D.; ADAMS, R.J.; BROWNSTEIN, D.G.; PATTERSON, R. Chronic active hepatitis in dogs associated with leptospires. **Am. J. Vet. Res.**, v.40, n.6, p. 839-44, jun. 1979.

BLAZIUS R.D.; ROMÃO, P.R.; BLAZIUS, E.M., DA SILVA, O.S. Ocorrência de cães errantes soropositivos para *Leptospira* spp. na cidade de Itapema, Santa Catarina, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.21, n.6, p.1952-1956, 2005.

BOLIN, C.A. Diagnosis of Leptospirosis: A re-emerging disease of companion animals. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery Small Animal**, v.11, p.166-171, 1996.

BOURTHY, P.; BREMONT, S.; ZININI, F.; GIRY, C.; PICARDEAU, M. Comparison of real-time PCR assays for detection of pathogenic *Leptospira* spp. in blood and identification of variations in target sequences. **J Clin Microbiol.**, v.49, n.6, p. 2154-60, 2011.

BRANGER, C. et al. Polymerase chain reaction assay specific for pathogenic *Leptospira* based on the gene hap1 encoding the hemolysis-associated protein-1. **FEMS Microbiol Lett.**, v.243, n. 2, p, 437-45, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de leptospirose**. Brasília; Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde, p.98, 1997.

BRENNER, Don J.; KAUFMANN, A.F.; SULZER, K.R.; STEIGERWALT, A.G.; ROGERS, F.C.; WEYANT, R.S. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 839-858, 1999.

BROD, C. S.; ALEIXO, J.A.G.; JOUGLARD, S.D.D.; FERNANDES, C.P.H.; TEIXEIRA, J.L.R.; DELLAGOSTIN, O.A. Evidência do cão como reservatório da leptospirose humana: isolamento de um sorovar, caracterização molecular e utilização em inquérito sorológico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Minas Gerais, v. 138, n.4, p.294-300, 2005.

BROWN, C.A.; ROBERTS, A.W.; MILLER, M.A.; BROWN, S.A.; BOLIN, C.A.; JARECKI-BLACK, J.; GREENE, C.E.; MILLER-LIEBL, D. *Leptospira interrogans* serovar Grippotyphosa infection in dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 209, n.7, p. 1265-7, out. 1996.

CASTRO, M.T.; HERNANDEZ, B.S.; AGUDELO, P.F.; ARROYAVE, E.S.; ZAVALA, J.C.; PUERTO, F.I. Current review of the epidemiology of leptospirosis. **Rev. Med. Inst. Mex. Seguro Soc.**, v.54, n.5, p. 620-5, set-out 2016.

CASTRO, J.R.; SALABERRY, R.R.S.; SOUZA, M.A.; LIMA-MONTEIRO, A.M.C. Sorovares de *Leptospira* spp. predominantes em exames sorológicos de caninos e humanos no município de Uberlândia, Estado de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Minas Gerais, v. 44, n. 2, p. 217-222, 2011.

CASTRO, V.; AZEVEDO, S.S.; GOTTI, T.B.; BATISTA, C.S.A.; GENTILI, J.; MARAES, Z.M.; SOUZA, G.O, VASCONCELLOS, S.A.; GENOVEZ, M.E. Soroprevalência da leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.75, n.1, p. 3-11, jan./mar., 2008.

CERQUEIRA, T.B.; ATHANAZIO, D.A.; SPICHLER, A.S.; SEGURO, A.C. Renal involvement in leptospirosis -- new insights into pathophysiology and treatment. **Braz J Infect Dis.** , v.12, n.3, p.248-52, jun 2008.

COLE, J. R.; SULZER, C. R.; PULSSELY, P. R. Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination. **Journal of Applied Microbiology**, v. 5, n. 6, p. 976-980, 1973.

CORDEIRO, F.; SULZER, C.R. *Leptospira interrogans*, serovar Copenhageni, isolated from a dog in Belo Horizonte, Brazil. **International Journal of Zoonosis**, v.7, n.2, p.38-41, 1983.

CORTES, J. A. **Epidemiologia: conceitos e princípios fundamentais**. São Paulo: Livraria Varela, p.227, 1993.

COSATE, M.R.; SOARES, S.C.; MENDES, T.A.; RAITTZ, R.Y.; MOREIRA, E.C.; LEITE, R.; FERNANDES, G.R.; HADDAD, J.P.; ORTEGA, J.M. Whole-Genome Sequence of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo Subtype Hardjoprajitno Strain Norma, Isolated from Cattle in a Leptospirosis Outbreak in Brazil. **Genome Announcements**, v.3, n.6, p. 1-2, nov. 2015.

COVISA. Coordenação de Vigilância em Saúde. **Programa de Vigilância e Controle de Leptospirose e Roedores do Município de São Paulo**. Prefeitura de São Paulo. Secretária Municipal de Saúde, São Paulo, p.143, 2013.

DESVARS, A.; CARDINALE, E.; MICHAULT, A. Animal leptospirosis in small tropical areas. **Epidemiol. Infect.**, v.139, n.2, set. 2011.

DOLHNIKOFF, M.; MAUAD, T.; BETHELEM, E.P.; CARVALHO, C.R. Pathology and pathophysiology of pulmonary manifestations in leptospirosis. **Braz. J. Infect. Dis.**, n.11, v.1., p.142-8, fev. 2007.

DREER, M. K. P. et al. Toxoplasmosis, leptospirosis and brucellosis in stray dogs housed at the shelter in Umuarama municipality, Paraná, Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v.19, n. 23, p. 1-5, 2013.

ELLIS, W.A; THIERMANN, A.B. Isolation of *Leptospira interrogans* serovar Bratislava from sows in Iowa. **Am J Vet Res.**, v.47, n.7, p.1458-60, 1986.

ELLIS, W.A. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.**, v.10, n.3, p. 463-78, nov. 1994.

ELLIS, W.A. Control of canine leptospirosis in Europe: time for a change? **Vet Rec.**, v.167, n.16, p. 602-5, out 2010.

ETISH, J.L.; CHAPMAN, P. S, KLAG A. R. Acquired nephrogenic *diabetes insipidus* in a dog with leptospirosis. **Jr. Vet. J.**, v.67, n.1, p.7, 2014.

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

FEIGIN, R.D.; LOBES L.A. Jr; ANDERSON, D.; PICKERING, L. **Human leptospirosis from immunized dogs**. *Ann Intern Med.*, v.79, n.6, p. 777-85, 1973.

FIGUEIREDO, Aline de O.; PELLEGRIN, A.O.; GONÇALVES, V.S.P.; FREITAS, E.B.; MONTEIRO, L.A..R.C.; OLIVEIRA, J.M.; OSÓRIO, L.A.R. Prevalência e fatores de risco para a leptospirose em bovinos de Mato Grosso do Sul. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 29, n.5, p. 375-381, maio 2009.

FONZAR, U. V.; LANGONI, H. Análise geográfica da ocorrência da leptospirose em humanos e em cães na cidade de Maringá, Paraná, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Minas Gerais, v.45, n.1, p. 100-105, jan./fev. 2012.

FRAGA, D.B.M. **Avaliação do papel do cão como reservatório na transmissão da leptospirose urbana**. 2008. 78 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, 2008.

FRANCEY, T.; BAUER, N.; SCHWEIGHAUSER, A. Evaluation of hemostatsis in 256 dogs with renal disease. **ACVIM Forum**, Seattle, WA, USA, 2013.

FRAUNE, C.K.; SCWEIGHAUSER, A.; FRANCEY, T. 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. **J Am Vet Med Assoc.**, v.242, n. 10, p. 1373-80. 2013

FREIRE, I.M.A.; VARGES, R.; LILENBAUM, W. Alterações na bioquímica hepática em cães com leptospirose aguda determinada por amostras do sorogrupo Icterohaemorrhagiae. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.9, p.2630-32, dez, 2008.

FURTADO, L.R.I.; FEHLBERG, M.F.B.; ÁVILA, M.O. Prevalência e avaliação de fatores de risco à leptospirose canina, no município de Pelotas-RS. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.64, p.57-61, 1997.

GALLAGHER, A. Leptospirosis in a dog with uveitis and presumed cholecystitis. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v.47, n.6, p. 162-7, 2011.

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

GAÑOZA, C.A.; MATTHIAS, M.A.; SAITO, M.; CESPEDES, M.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J.M. Asymptomatic renal colonization of humans in the peruvian Amazon by *Leptospira*. **Plos Negl Trop Dis**, v.4, n.2, p. 1-10, fev. 2010.

GEISEN, V.; STENGEL, C.; BREM, S.; MULLERY, W.; GREENEZ, C.; HARTMANN, K. Canine leptospirosis infections - clinical signs and outcome with different suspected *Leptospira* serogroups (42 cases). **Journal of Small Animal Practice**, v. 48, p.324-328, 2007.

GENDRON, K.; WALTER, C.S.; SCHWEIGHAUSER, T.; FRANCEY, T.; DOHERR, M.G.; LANG, J. Serial CT features of pulmonary leptospirosis in 10 dogs. **Veterinary Record**, v. 174, n. 169, 2014.

GLEAN. Global Leptospirosis Environmental Action Network. Meeting Report. In: **3rd Meeting, Mar 12-14**. Brasília, Brasil, 2013.

GREENLEE, J.J.; ALT, D. P.; BOLIN, C.A.; ZUERNER, R.L.; ANDREASEN, C.B. Experimental canine leptospirosis caused by *Leptospira interrogans* serovars Pomona and Bratislava. **Am. J. Vet. Res.**, n.10, p. 1816-22, 2005.

GOLDSTEIN, Richard E.; LIN, R.C.; LANGSTON, C.E.; SCRIVANI, P.V.; ERB, H.N.; BARR, S.C... Influence of infecting serogroup on clinical features of leptospirosis in dogs. **J Vet Intern Med.**, v. 20, n.3, p. 489-94, mai./jun. 2006.

GOLDSTEIN, Richard E. Canine Leptospirosis. **Vet Clin North Am Small Anim Pract.**, v.40, n.6, p. 1091-1101, nov. 2010.

GONÇALEZ, C.C.; PAES, A.C.; LANGONI, H.; Da SILVA, R.C.; GRECA, H.; CAMOSSI, L.G.; GUIMARÃES, F.F.; ULLMANN, L.S. Anticorpos para *Leptospira* spp., *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em cães errantes albergados em canil privado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n.4, p.1011-1014, 2010.

GREENE, Craig E. et al. Leptospirose. In: GREENE, Craig E. **Doenças Infecciosas em cães e gatos**. 4ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. v.1, cap. 42, p. 932-66.

GUIMARÃES, M.C. Epidemiologia e controle da leptospirose em bovinos: papel de portador e seu controle terapêutico. **Revista Faculdade Medicina Veterinária Zootecnia USP**, São Paulo, v.6/7, p. 21-34, 1982.

HAAKE, David A.; ZÜCKERT, Wolfram R. The Leptospiral Outer Membrane. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 387, P. 187-221, 2015.

HAAKE, David A.; LEVETT, Paul.N. Leptospirosis in Humans. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 387, p. 65–97, 2015.

HAAKE, David A.; MATSUNAGA, James. Leptospira: A Spirochete with a Hybrid Outer Membrane. **Mol. Microbiol.**, v. 77, n.4, p. 805-14, ago. 2010.

HAGIWARA, M. K.; MIOTTO, B. A.; TOZZI, B. F. Revisão sobre a leptospirose canina no Brasil. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v.20, n.119, p. 86-104, 2015

HAGIWARA, M.K.; MIOTTO, B.A.; KOGIKA, M.M. Leptospirose. In: JERICÓ, M.M; DE ANDRADE NETO, J.P.; KOGIKA, M.M. **Tratado de Medicina Interna de cães e gatos**. 1ª Edição, Rio de Janeiro: Roca, 2015, v.1., cap.102, p.877-89.

HAGIWARA, M. K. Leptospirose canina. **Boletim Técnico: Pfizer Saúde Animal**, p. 1-6, nov. 2003.

HAGIWARA, M.K.; LUSTOSA, M.; KOGIKA, M.M. Leptospirose canina. **Vet News**, ano XI, n. 67, p.7-8, 2004.

HARKIN, K.R.; GARTRELL, C.L. Canine leptospirosis in New Jersey and Michigan: 17 cases (1990-1995). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 32, n 6, p. 495-50, nov. 1996.

HARKIN, K.R.; ROSHTO, Y.M.; SULLIVAN, J.T.; PURVIS, T.J.; CHENGAPPA, M.M. Comparison of polymerase chain reaction assay, bacteriologic culture, and serologic testing in assessment of prevalence of urinary shedding of leptospires in dogs. **J Am Vet Med Assoc.**, v.222, n.9, p.1230-3, 2003.

HARRIS, B.M.; BLATZ, P.J.; HINKLE, M.K.; McCALL, S.; BECKIUS, M.L.; MENDE, K.; ROBERTSON, J.L.; GRIFFITH, M.E.; MURRAY, C.K.; HOSPENYHAL, D.R. *In*

*vitro* and *in vivo* activity of first generation cephalosporins against *Leptospira*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 85, n.5, p. 905-8, 2011.

HARTMAN, E. G. Epidemiological aspects of canine leptospirosis in the Netherlands. **Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene**, v. 258, p. 350–359, 1984.

HARTMANN, Katrin; E. G.; EGBERINK, H.; PENNISI, M.G. et al. *Leptospira* species infection in cats – ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.15, p. 576–581, 2013.

HAUNZ E.A., CARDY JD. Canicola fever report of nine cases in one family, with abstract of the world literature. **AMA Arch Intern Med.**, v.89, n.6, p. 978-93, 1952. 1952.

HOMEM, V.S.F.; HEINEMANN, M.B. , MORAES, Z.M.; VASCONCELLOS, S.A.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J.S. Estudo epidemiológico da leptospirose bovina e humana na Amazônia Oriental brasileira. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.34, n.1, p.173-180, 2001.

HOOKEY, J.V. PALMER, M.F. A comparative investigation and identification of *Leptospira interrogans* serogroup icterohaemorrhagiae strains by monoclonal antibody and DNA fingerprint analyses. **Zentralbl Bakteriol.**, v. 275, n. 2, p. 185-99, 1991.

HUGONNARD, M.; DJELOUADJI, Z.; POUYOT-NEVORET, C. et al. Evaluation of polymerase chain reaction in the diagnosis of canine leptospirosis: comparison with serologic testing in 33 dogs. **Proceedings of ECVIM-CA Congress**. 2011, Seville, Spain.

JOHNSON, S.E. Afecções do fígado. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. São Paulo, Manole, 1997. 2: 2355-73.

JORGE, R.S.P.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J.S.; VASCONCELLOS, S.A.; De MORAIS, Z.M.; LIMA; E.S.; SOUZA; G.O. Exposure of free-ranging wild carnivores, horses and domestic dogs to *Leptospira* spp. in the Northern Pantanal, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.106, n.4, p. 441-444, jun. 2011.

JUVET, F.; SCHULLER, S.; O'NEILL, E.J.; O'NEILL, P.A.; NALLY, J.E.. Urinary shedding of spirochaetes in a dog with acute leptospirosis despite treatment. **Vet Rec.**, v. 168, n.21, p. 564, 2011.

KOGIKA, M.M.; HAGIWARA, M.K.; BACCARO, M.R. Metastatic calcification in a dog with leptospirosis. **Canine Practice**, v.17, n.4, p.35-8, 1992.

KLAASEN, H. L. MOLKENBOER, M.J.; VRIJENHOEK, M.; KAASHOEK, M.J. Duration of immunity in dogs vaccinated against leptospirosis with a bivalent inactivated vaccine. **Vet Microbial.**, v. 95, n. 1-2, p. 121-32, 2003.

KLAASEN, H.L.B.M.; VAN DER VEEN, M.; SUTTON, D.; MOLKENBOER, M.J.C.H. A new tetravalent canine leptospirosis vaccine provides at least 12 months immunity against infection. *Vet Immunol pathol.*, v. 158, n. 1-2, p. 26-9, 2014.

KLARENBECK, A; SCHUFFNER, W.A.P. Appearance in Holland of *Leptospira* differing from Weil Strain. **Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde**, v.77, p. 4271-4276, 1933.

KLOPFLEISCH, R.; KOHN, B.; PLOG; S.; WEINGART, C.; OCKLER, N"; GRUBER, A.D. Case Report - An Emerging Pulmonary Haemorrhagic Syndrome in Dogs: Similar to the Human Leptospiral Pulmonary Haemorrhagic Syndrome? **Veterinary Medicine International**, p.1-7, dez. 2010.

KO, Albert I.; GOARANT, Cyrille; PICARDEAU, Mathieu. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nat. Rev. Microbiol.**, v.7, n. 10, p. 736-47, out. 2009.

KO, A.; REIS, M.G.; DOURADO, C.M.R.; JOHNSON Jr., W.D.; RILEY, L.W. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. **Lancet**, v. 354, n. 9181, p. 820-5, 1999.

KODJO, A.; CALLEJA, C.; LOENSER, M.; LIN, D.; LIZER, J. A Rapid In-Clinic Test Detects Acute Leptospirosis in Dogs with High Sensitivity and Specificity. **Biomed Res Int.**, v. 2016, Article ID 3760191, p. 1- , 2016.

KOHN, B. ; ARNDT, G.S.; GRUBER, A.D.; GUERRA, B.; JANSEN, A.; KASERHOTZ, B.; KLPPFLEISCH, R.; LOTZ, F.; LUGE, F.; NÖCKLER, K. Pulmonary abnormalities in dogs with leptospirosis. **J. Vet. Intern. Med.**, v.24, n.6, dez. 2010.

KOGIKA, M. M., HAGIWARA, M.K., MIRANDOLA, R. M. S. Alterações bioquímicas na leptospirose canina. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 27, n. 2, p. 177-182, 1990.

KOGIKA, M.M.; HAGIWARA, M.K.; BACCARO, M.R. Metastatic Calcification in a dog with leptospirosis. **Canine Pract**, v. 17, p.35-38, 1992.

KORVER, H. et al. Classification of the Icterohaemorrhagiae serogroup by monoclonal antibodies. **Israel Vet Med.**, v. 44, p. 15–18, 1988.

LANGONI, L. Leptospirose: aspectos de saúde animal e de saúde pública. **Revista de Educação Continuada do CRMV – SP**, v.2, n.1, p.52-58, 1999.

LANGSTON, C.E.; HEUTER, K.J. Leptospirosis: A re-emerging zoonotic disease. **Vet Clin North Am Small Anim Pract.**, v. 33, n.4, p. 791-807, jul. 2003.

LANGSTON, C. Acute uremia. In: **Veterinary Internal Medicine**. Ed S. J. F. Ettinger, E. C. Saunders, St Louis, MO, USA, p. 1969-1984, 2010.

LAVINSKY, M. Oliveira; SAID, R.A.; STRENZEL, G.M.R.; LANGONI, H. Seroprevalence of anti-*Leptospira* spp. antibodies in dogs in Bahia, Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 106, n.1, p.79-84, set. 2012.

LEE, S.H.; GUPTILL, L.; JOHNSON, A.J.; MOORE, G.E. Signalment Changes in Canine Leptospirosis between 1970 and 2009. **J Vet Intern Med**, v. 28, p. 294–299, 2014.

LEE, S.H.; KIM, K.A.; PARK, Y. G.; SEONG, I.W.; KIM, M.J.; LEE, Y.J. Identification and partial characterization of a novel hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar lai. **Gene**, v. 254, n. 1-2, p. 19-28, 2000.

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

LEVETT, P.N. Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. **Clin Infect Dis.**,v. 36, n.4, p.447-52, 2003.

LEMOES, J.P.; MELO, C.B.; VIEGAS, S.A.R.A. Análise sorológica de *Leptospiras* spp. em cães errantes no município de Aracaju. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.14, p. 1-16, 2010.

LIN, X. et al. Application of a loop-mediated isothermal amplification method for the detection of pathogenic *Leptospira*. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v.63, n.3, p.237-42, 2009.

LIZER, J.; GRAHLMANN, M.; HAPKE, H.; VELINENI, S.; LIN, D; KOHN, B. Evaluation of a rapid IgM detection test for diagnosis of acute leptospirosis in dogs. **Veterinary Record**, p. 1-5, 2017.

De MAELE , I Van; . ; CLAUS, A.; HAESEBROUCK, F.; DAMINET, S. Leptospirosis in dogs: a review with emphasis on clinical aspects. **The Veterinary Record**, v.163, n.19, p.409-13, out. 2008.

MAJOR, A., SCHWEIGHAUSER, A.; FRANCEY, T. Increasing Incidence of Canine Leptospirosis in Switzerland. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.11, p. 7242-7260, 2014.

MARKOVICH J.E.; ROSS L.; McCOBB, E.. The prevalence of leptospiral antibodies in free roaming cats in Worcester County, Massachusetts. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 26, p. 688–689, 2012.

MASCOLLI, R.; PINHEIRO, S.R.; VASCONCELLOS, S.A. et al. Inquérito sorológico para leptospirose em cães do Município de Santana de Parnaíba, São Paulo, utilizando a campanha de vacinação anti-rábica do ano de 1999. **Arq. Inst. Biol.**, v.69, p.25-32, 2002.

MASCOLLI, R; SOTO, F.R.M.; BERNARDI, F.; ITO, F. H. et al . Prevalência e fatores de risco para a leptospirose e brucelose na população canina da Estância Turística de Ibiúna, São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.83, p. 1-7, 2016.

MASTRORILLI, C. et al. Clinicopathologic features and outcome predictors of *Leptospira interrogans* Australis serogroup infection in dogs: A retrospective study of 20 cases (2001–2004). **J Vet Intern Med**, v. 21, p.3-10, 2007.

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

MÉRIEN, F; AMOURIAUX, P.; PEROLAT, P; BARANTON, G.SAINT GIRONS, I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. **J Clin Microbiol.**, v.30, n.9, p. 2219-24, 1992.

MEYER, D.J.; COLES, E.H; RICH, L.J. **Medicina de Laboratório Veterinária. Interpretação e diagnóstico**. São Paulo: Roca, 1995.

MICHEL, E. KOOK, P.H.; VOSS, K.; BORETT, I.M.; REICHLER, I.W. Generalized metastatic intestinal and cutaneous calcinosis in a Hovawart puppy with leptospirosis. **Schweiz Arch Tierheilkd**, v.153, p. 27-31, 2011.

MILLÁN, J.; CANDELA, M.G.LPÉZ-BAO, J.V.; PEREIRA, M. JIMENÉZ, M A.; LEÓN-VISCAÍNO, L . Leptospirosis in wild and domestic carnivores in natural areas in Andalusia, Spain. **Vector-Borne Zoonot. Dis.**, v.9, n.5, p.549-554, 2009.

MILLER, M.D; ANNIS, K.M., LAPPIN, M.R. et al. Variability in results of the microscopic agglutination test in dogs with clinical leptospirosis and dogs vaccinated against leptospirosis. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 25, n.3, p.426-32, 2011.

MIYAHARA, Satoshi; SAITO, M.; KANEMARU, T.; VILLANUEVA, S.Y.; GLORIANI, N.G.; YOSHIDA, S.I. Destruction of the hepatocyte junction by intercellular invasion of *Leptospira* causes jaundice in a hamster model of Weil's disease. **International Journal of Experimental Pathology**, v.95, p.271-81, 2014.

MYBURGH, J.G.; POSNETT S.J.; LAWRENCE, J.V. Serological survey for canine leptospirosis in the Pretoria area. **J. S. Afr. Vet. Assoc.**, South Africa, v. 64, n.1, p. 37-8, 1993.

MYERS, D. M. **Manual de métodos, para el diagnóstico de laboratorio de la leptospirosis**. Martinez: OPAS, Centro Panamericano de Zoonosis, 1985.

MODOLO, José Rafael; LANGONI, H.; PADOVANI, C.R.; HIROTO, F.; SHIMABUKURO, A.O.; MENDONÇA, VICTORIA, C.; Da SILVA, W.B. Investigação soropidemiol gica de leptospirose canina na área territorial urbana de Botucatu, São Paulo, Brasil. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 43, n. 5, p. 598-604, 2006.

MONAHAN, A.M.; MILLER I.S.; NALLY, J.E.. Leptospirosis: risks during activities. **Journal of Applied Microbiology**, v.107, n.3, p. 707-16, set. 2009.

MUNDAY, J.S.; BEGEN, D.J.; ROE, W.D. Case report - Generalized calcinosis cutis associated with probable leptospirosis in a dog. **Veterinary Dermatology**, v.16, p.401-6, 2005.

NALLY, J.E. et al. Alveolar septal deposition of immunoglobulin and complement parallels pulmonary hemorrhage in a guinea pig model of severe pulmonary leptospirosis. **Am J Pathol.**, v. 164, n. 3, p. 1115-27, mar. 2004.

NALLY, J. E.; CHANTRANUWAT, C.; WU, X.Y.; FISHBEIN, M.C.; Da SILVA, J.J.P.; BLANCO, D.R. LOVETT, M.A. Complete Genome Sequence of *Leptospira alstonii* serovar Room22 Strain GWTS #1. **Genome Announcements**, v.4, n.6, p. 1-2, nov. 2016.

OLIVEIRA, F.C.S.; AZEVEDO, S.S.; PINHEIRO, S.R.; VIEGAS, S.A.R.A., BATISTA, C.S.A.; COELHO, C.P.; MORAES, Z.M.; SOUZA, G.O.; GONÇALES, A.P.; ALMEIDA, C.A.S., VASCONCELLOS, S.A. Soroprevalência de leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no estado da Bahia. **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo, v.76, n.4, p.539-46, out./dez., 2009.

OLIVEIRA, S.T.; MESSICK, J.B.; BIONDO, A.W.; Dos SANTOS, A.P., et al. Exposure to *Leptospiras* spp. in sick dogs, shelter dogs and dogs from an endemic area: points to consider. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.40, n. 3, p. 1056-1062, 2012.

PANAPHUT, T.; DOMRONGKITCHAIPOORN, S.; VIBHAGOOOL, A.; THINKAMROP, B.; SUSANENGAT, W. Ceftriaxone compared with sodium penicillin g for treatment of severe leptospirosis. **Clin Infect Dis.**, v.36, n. 12, p.1507-13, 2003.

PAULA, E. V. Leptospirose Humana: uma análise climato-geográfica de manifestação no Brasil, Paraná e Curitiba. In: XII SIMPÓSIO BRASILEIRO DE SENSORIAMENTO REMOTO, 2005, Goiânia, Brasil. **Anais do XII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto**, p. 2301-2308, 2005.

PAGANIN, F.; BOURDIN, A.; BORGHERINI, G.; DALBAN, C.; POUBEAU, P.; TIXIER, F.; GOUIX, A.; NOEL, J. B.; COTTE, L.; ARVIN-BEROD, C. Pulmonary manifestations of leptospirosis. **Revue des Maladies Respiratoires**, v. 28, n. 9, p.131-9, 2011.

PHIMDA, K.; SIRIWAN, H.; SUTTINONT, C. et al. Doxycycline versus azithromycin for treatment of leptospirosis and scrub typhus. **Antimicrob Agents Chemother**, v.51, n.9, p. 3259-63, sep 2007.

RIBOTTA, M.J.; HIGGINS, R.; GOTTSCHALK, M.; LALLIER, R. Development of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of leptospiral antibodies in dogs. **Can J Vet Res.**, v. 64, n.1, p. 32-7, 2000.

RISSI, Daniel R.; BROWN, Cathy A. Diagnostic features in 10 naturally occurring cases of acute fatal canine leptospirosis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.26, n.6, p. 799-804, 2014.

RODRIGUES, A.M.A. et al. Isolamento de *Leptospiras* spp. de cães com diagnóstico clínico de leptospirose em São Paulo (Brasil). **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, n.2, p.705-714, 2007.

RODRIGUES, A.M.A.; HAGIWARA, M.K.; MORAES, Z.M.; SOUZA, G.O.; GONÇALVES, A.P.; SILVA, A.Q.; VASCONCELLOS, S.A. *Leptospira* isolation & characterization - ACVIM 2012. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, p.2012, 2012.

RODRIGUES, A.M.A.; VASCONCELLOS, S.A.; GONÇALES, A.P.; MORAES, Z.M.; SOUZA, G.O.; HAGIWARA, M.K. Antibody revealed by growth inhibition test of leptospires *in vitro* (GIT) against serovars Canicola, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa and Pomona bacterins. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.5, p.627-34, 2013.

RODRIGUEZ J. et al. Feline leptospirosis: a serologic and urinary PCR survey in healthy cats and in cats with kidney disease. **Proceedings of the 30<sup>th</sup> Annual Congress of the American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM)**: New Orleans, USA, p. 790–791, 30 de maio a 2 de junho, 2012.

ROJAS, P; MONAHAN, A.M.; SCHULLER, S.; MILLER, I.S.; MARKEY, B;[.K.; NALLY, J.E. Detection and quantification of leptospires in urine of dogs: a maintenance host for the zoonotic disease leptospirosis. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v.29, n.10, p.1305-9, 2010.

ROMERO, E.C.; BERNARDO C.C.M.; YASUDA, P.H. Human leptospirosis: a twenty-nine-year serological study in São Paulo, Brazil. **Revista Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v. 45, p. 245-248, 2003.

ROMERO, E. C.; YASUDA, P. H. Molecular characterization of *Leptospira* sp. strains isolated from human subjects in São Paulo, Brazil using a polymerase chain reaction-based assay: a public health tool. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n.4, p. 373-378, jun. 2006.

ROSSETTI, C.A.; LIEM, M.; SAMARTINO, L.E.; HARTSKEERL, R.A. Buenos Aires, a new *Leptospira* serovar of serogroup Djasiman, isolated from an aborted dog fetus in Argentina. **Vet Microbiol.**, v. 107, n. 3-4, p.241-8, 2005.

RUBEL, D.; SEIJO, A.; CERNIGOI, B. et al. *Leptospira interrogans* en una poblacion canina del gran Buenos Aires: variables asociadas com la seropositividad. **Rev. Panam. Salud Publ.**, v.2, p.102-105, 1997.

SANTORO, M.L.; KOGIKA, M.M.; HAGIWARA, M.K.; MIRANDOLA, R.M.; CASTELAR, I. L.C.G. Decreased Erythrocyte osmotic fragility during canine leptospirosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 36, n.1, p. 1-5, jan./fev. 1994.

SCANZIANI, E.; ORIGGI, F.; GIUSTI, A.M.; IACCHIA, G.; VASINO, A.; PIROVANO, G.; SCARPA, P.; TAGLIAABUE, S. Serological survey of leptospiral infection in kennelled dogs in Italy. **J Small Anim Pract.**, v. 43, n.4, p. 154-7, 2002.

SCHULLER, S.; FRANCE, T.; HARTMANN, K.; HUGONNARD, M.; KOHN, B.; NALLY, J.E. European Consensus Statement on Leptospirosis in dogs and cats. **Journal of Small Animal Practice**, v. 56, p.159–179, mar. 2015a.

SCHULLER, S.; CALLANAN, J.J.; WORRALL, S.; FRANCEY, T.; SCHWEIGHAUSER, A.; KOHN, B.; KLOPFLEISCH, H.P.; NALLY, J.E. Immunohistochemical detection of IgM and IgG in lung tissue of dogs with leptospiral pulmonary haemorrhage syndrome (LPHS). **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, n. 40, p. 47-53, 2015b.

SCHWEIGHAUSER, A. ;BURGENER, I.A.; GASCHEN, F. et al. Small intestinal intussusception in five dogs with acute renal failure and suspected leptospirosis (*L.australis*). **J. Vet. Emerg. Crit. Care**, v.19, n.4, p.363-8, 2009.

SCHWEIGHAUSER, A.; FRANCEY, T. Treatment of pulmonary haemorrhage in canine leptospirosis with desmopressin and dexamethasone. **18th Annual conference of the European College of Veterinary Internal Medicine**, Gent, Belgium, 2008.

SILVA,W.B. et al. Inquérito sorológico e distribuição espacial da leptospirose canina em área territorial urbana da cidade de Botucatu, São Paulo. **Veterinária e Zootecnia**. Brasil, v.16, n.4, p.656-68, 2009.

SILVA F.S. et al. Prevalência e fatores de risco de leptospirose bovina no Estado do Maranhão. **Pesq. Vet. Bras.**, v.32, n.4, p. 302-12, 2012.

SMITS, H. L.; EAPEN, C.K.; SUGATHAN, S.; KURIAKOSE, M. et al. Lateral-flow assay for rapid serodiagnosis human leptospirosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, p. 166–169, 2001.

SONRIER, C; BRANGER, C.; MICHEL, V.; RUVOËN-CLOUET, N. GANIÈRE, J.P.; ANDRÉ-FONTAINE, G. Evidence of cross-protection within *Leptospira interrogans* in an experimental model. **Vaccine**, v.19, n. 1, p. 86-94, 2001.

SOUZA, L. A. et al. Prevalência de infecção por *Brucella canis* em Belo Horizonte, MG. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.24, n.3, 2002.

SPEELMAN. Leptospirosis .In: FAUCI, A.S. et al. **Harrisons´s principles of Internal Medicine**. New York: Mcgraw-Hill, p.1036-7, 1995.

SYKES, J.E.; HARTMANN, K.; LUNN, K.F.; WOORE, G.E.; STODDOARD, R.A.; GOLDSTEIN, R.E. 2010 ACVIM small animal consensus statement on leptospirosis: diagnosis, epidemiology, treatment, and prevention. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 25, n.1, p. 1-13, jan-fev 2011.

TOWNSEND, W.M., STILES, J., KROHNE, S.G. Leptospirosis and panuveitis in a dog. **Vet. Ophthalmol.** , v.9, n.3, p. 169-73, 2006.

TRIVEDI, S.V.; VASAVA, A.H.; BHATIA, L.C.; PATEL, N.K.; PATEL, N.T. Plasma exchange with immunosuppression in pulmonary alveolar haemorrhage due to leptospirosis. **Indian J Med Res.**, v. 131, p. 429-33, mar 2010.

TRUCOLLO, J.; CHARAVAY, F.; MERIEN, F.; PEROLAT, P. Quantitative PCR assay to evaluate ampicillin, ofloxacin, and doxycycline for treatment of experimental leptospirosis. **Antimicrob Agents Chemothe**, v.46, n.2, p. 848-53, 2002.

VAN DEN BROEK, A. H. M.; THRUSFIELD, M. V.; DOBIET, G. R.; ELLIST, W. A. A serological and bacteriological survey of leptospiral infection in dogs in Edinburgh and Glasgow. **Journal of Small Animal Practice**, v. 32, n. 3, p. 118-124, 1991.

VASCONCELLOS, S.A. O papel dos reservatórios na manutenção de leptospirose na natureza. **Comunicações Científicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v.11, p.17-24, 1987.

VASCONCELLOS, S.A. Leptospirose animal. In: **III Encontro Nacional em leptospirose**, Rio de Janeiro, p.62-65, 1993.

VENKATARAMAN, K.S.; NEDUNCHELLIAN, S. Epidemiology of an outbreak of leptospirosis in man and dog. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis.**, v.15, n.4, p. 243-7, out. 1992.

WARD, M.P. Seasonality of canine leptospirosis in the United States and Canada and its association with rainfall . **Preventive Veterinary Medicine**, v. 56, p.203-13, 2002.

WHERTS, C.; TAPPING, R.I.; MATHISON, J.C.; CHAUNG, T.H. et al. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. **Nat Immunol.**, v. 2, n.4, p. 346-52, abr. 2001.

WHO. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. Geneva: **World Health Organization**. 2003.

WOLFFENBUTTEL, S. et. al.. Achados Clínico-laboratoriais em Sete Cães com Resposta Sorológica à Leptospirose. **MEDVEP Rev Cientif Med Vet Pequenos Anim Anim Estim**, v.2, n.5, p. 44-50, 2004.

WU, D. et al. Low-dose norfloxacin and ciprofloxacin therapy worsen leptospirosis in hamster. **Microb Pathog.**, v.102, p.36-41, jan. 2017

XU, Yinghua et al. Genomic Analysis of a New Serovar of *Leptospira weilii* Serogroup Manhao. **Frontiers in Microbiology**, v.8, n.129, p. 1-10, fev. 2017.

XUE, Feng; YAN, Jie; PICARDEAU, Mathieu. Evolution and pathogenesis of *Leptospira* spp.: lessons learned from the genomes. **Microbes and Infection**, v.11, p. 328 – 333, 2009.

YASUDA, P.H., SANTA ROSA, C.A.; YANAGUITA, R.M. Variação sazonal na prevalência de Leptospirose em cães de rua da cidade de São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Públ.**, S. Paulo, v. 14, p. 589-96, 1980.

ZHANG, W. et al. Efficacy of cefepime, ertapenem and norfloxacin against leptospirosis and for the clearance of pathogens in a hamster model. **Microb Pathog.**, v.7, p.78-83, 2014.













