

UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO
Curso de Medicina Veterinária

Carolina Pierotti

AVALIAÇÃO DO PERFIL BIOQUÍMICO SÉRICO EM CÃES
REAGENTES PARA *LEPTOSPIRA spp.*

São Paulo
2016

Carolina Pierotti

**AVALIAÇÃO DO PERFIL BIOQUÍMICO SÉRICO EM CÃES
REAGENTES PARA *LEPTOSPIRA spp.***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao curso de Medicina Veterinária da Universi-
dade de Santo Amaro - UNISA como requisito
parcial para obtenção do título bacharel em
Medicina Veterinária
Orientador: Prof. Dra. Elizabeth Bohland

São Paulo

2016

Carolina Pierotti

**AVALIAÇÃO DO PERFIL BIOQUÍMICO SÉRICO EM CÃES
REAGENTES PARA *LEPTOSPIRA spp.***

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

Orientador: Prof. Dra. Elizabeth Bohland

São Paulo ____ de _____ de 2016

Banca Examinadora

Prof. Dra. Elizabeth Bohland

Prof. Dra. Amane Paldês Gonçalves

AGRADECIMENTOS

Gostaria primeiramente de agradecer a minha orientadora, Elizabeth Bohland. Por todo o apoio durante esse um ano e meio de iniciação científica e trabalho de conclusão de curso, um caminho que não foi fácil mas com certeza foi gratificante. Obrigada por todas as broncas e puxões de orelha que com certeza ajudaram no meu crescimento pessoal e acadêmico. Obrigada por nunca ter desistido de mim e do meu trabalho e por sempre ter acreditado em mim.

Agradeço a minha melhor amiga, irmã de alma e vida, Mariana Chiconelo (CHICO) por todos esses anos de amizade, companheirismo, sem você com certeza eu não teria conquistado metade das coisas e não estaria me formando. Obrigada por sempre estar ao meu lado, me fazendo rir e me dando broncas. Minha eterna companheira de iniciação científica, congressos, obrigada por sempre estar ao meu lado e sempre me incentivar. Obrigada por sempre ter acreditado em mim.

Agradeço também a minha amiga Isabele Caroline, meu buda, minha paz interior. Obrigada por esses 5 anos em que você me ajudou e me acalmou e com certeza fez a minha graduação e as minhas manhas muito melhores.

Agradeço as maravilhosas Maina Marcelhas e Mariane Regis, por todos os conselhos, as risadas e por tudo o que fizeram por mim e ainda fazem.

As minhas melhores amigas, Lara e Regina Bukauskas, pelos anos de amizade, por todos os conselhos e por todo drama que aguentam de mim por todos esses anos.

Ao HOVET-UNISA, por sempre me proporcionar uma experiência profissional, acadêmica e pessoal muito intensa e gratificante, por todos os estágios e monitorias.

Obrigada a equipe do laboratório HOVET-UNISA, além de terem participado do meu trabalho de conclusão de curso, estiveram comigo todos os meses do meu estágio obrigatório. Obrigada Fábio Novelli Martorelli e Paula Zanini, por todo o ensinamento, por todas as risadas, foi o melhor ambiente de estágio que eu fiz até hoje, obrigada por toda a confiança que vocês depositaram em mim, por todos os conselhos e por toda ajuda tanto na iniciação quanto no trabalho de conclusão de curso.

Agradeço também a professora Amane Paldês Gonçalves, sem você este projeto não o teria sido possível, obrigada por sempre ter me dado apoio e a base que eu precisava e por sempre ter me aguentado correndo desesperada para sua sala e me acalmado.

E por fim agradeço meus pais, Fátima e Francisco, sem vocês nada disso aconteceria, obrigada por sempre me darem base, apoio e confiança.

“Que vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia ser impossível” (Charles Chaplin)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3. OBJETIVOS	18
3.1 OBJETIVO GERAL	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1 AMOSTRAS	18
4.2 METODOLOGIA DE ANÁLISE.....	19
4.3. FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS	20
5. RESULTADOS	20
6. DISCUSSÃO	24
7. CONCLUSÃO.....	25
REFERÊNCIAS.....	26

Lista de tabelas

Tabela 1	20
Tabela 2.....	22

RESUMO

A subnotificação da Leptospirose canina aliada às condições precárias em que vive boa parte da população nos grandes centros urbanos contribui para a ocorrência desta zoonose. No presente trabalho temos como objetivo a avaliação renal e hepática através de parâmetros bioquímicos de cães reagentes a diferentes sorovares de *Leptospira spp.*, oriundos de campanhas de castração realizadas na região Sul da cidade de São Paulo e no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Santo Amaro- UNISA, São Paulo/SP. Para tal, foram avaliadas quarenta e nove amostras de soro de cães reagentes, coletadas nas Campanhas, e armazenadas congeladas no laboratório até a realização dos testes, a saber: alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), ureia, creatinina, proteína total, albumina e globulinas. Das quarenta e nove amostras analisadas, catorze foram reagentes para dois ou mais sorovares. Os resultados dos testes da função hepática e renal mantiveram dentro da normalidade da espécie. Os autores concluíram que os resultados dos testes de função hepática e renal não auxiliam na verificação do “status” sorológico de cães reagentes, naturalmente infectados pela *Leptospira spp.*

Palavras-chave: Leptospirose canina, diagnóstico, zoonose

ABSTRACT

The undernotification of canine leptospirosis and the poor conditions of life on urban centres both contribute to the occurrence of this zoonosis. At the present paper, our objective is to evaluate the kidney and hepatic functions through biochemical parameters of dogs that were reagents for different serovars of *Leptospira spp.* and participated on castration campaigns at the south region of São Paulo and at the hospital of the Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Santo Amaro- UNISA, São Paulo/SP. Forty-nine samples of serum from reactive dogs were collected in the Campaigns and stored frozen in the laboratory until the tests were performed, namely: alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (FA), urea, creatinine, total protein, albumin and globulins. Of the forty-nine samples analyzed, fourteen were reagents for two or more serovars. The results of liver and kidney function tests remained within the normal range of the species. The authors concluded that the results of liver and kidney function tests did not help to verify the serological status of reactive dogs naturally infected with *Leptospira spp.*

Keywords: Canine leptospirosis, diagnostic, zoonosis

1.Introdução

A leptospirose é uma zoonose de importância mundial, considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma doença negligenciada e subnotificada, causada por *Leptospiras* patogênicas transmitidas pelo contato direto ou indireto com urina de animais infectados ^{1,2,3}.

A *Leptospira* é uma bactéria da ordem *Spirochaetales*, da família *Leptospiraceae* e o gênero é a *Leptospira*. Têm o formato helicoidal com endoflagelos e extremidade em forma de gancho, há a forma patogênica e não patogênica ⁴.

A *Leptospira* sobrevive em ambientes quentes e úmidos, onde ocorre principalmente em países em desenvolvimento, onde há mais chances de exposição à bactéria, seja pela população humana ou animal. O maior pico da doença ocorre nos meses de verão onde a temperatura é fator determinante para a sobrevivência das *Leptospiras* ³.

No município de São Paulo, os contrastes sociais, o crescimento intenso e desordenado, as precárias condições de saneamento básico e de moradia e a alta infestação de roedores infectados contribuem para a disseminação da doença ^{5,6,7}. Além disso, nas últimas décadas, a urbanização e as mudanças sociais tem favorecido o aumento da população canina nos países em desenvolvimento ⁸. Este aumento, associado com as relações emocionais e estreita convivência entre o homem e 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 ^{9,10}.

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, além os casos não registrados ¹¹. Na cidade de São Paulo, a média anual no período de 2001 a 2011, foi de 288 casos. Dentre eles 44 óbitos, totalizando letalidade de 15,5% ¹².

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 *grippotyphosa*, respectivamente. A ocorrência de diferentes sorovares de *Leptospira spp.* no homem, no cão e nos outros animais domésticos e silvestres está na dependência de reservatórios existentes no ecossistema onde vive o hospedeiro acidental ¹³.

Nos animais acometidos com o sorotipo *canicola* ocorre um quadro clínico de nefrite e gastroenterite, e em alguns casos, a infecção é assintomática nos cães. Quando ocorrem alterações renais, o animal apresenta sinais clínicos importantes, como urêmia, insuficiência renal, enterite hemorrágica, coma e morte. O sorotipo *icterohaemorrhagiae*, na maioria das vezes, causa a síndrome ictérico-hemorrágico. Geralmente essa síndrome é aguda e se manifesta clinicamente por hipertermia, prostração, hemorragias em todo o organismo, especialmente nos pulmões e aparelho digestivo e pode também ocorrer uma falência hepática ¹⁴.

A gravidade da doença é influenciada pela idade do animal, virulência do sorovar, órgãos e sistemas atingidos, grau da exposição, status vacinal e pela resposta imune do hospedeiro ¹⁵. Nos cães que conseguem sobreviver à fase aguda da leptospirose, as *Leptospiras* atingem a luz dos túbulos contornados renais e passam a ser eliminadas por meio da urina por períodos de tempo variáveis, caracterizando a fase de leptospirúria. Desta forma, os cães e outros animais domésticos e silvestres, tornam-se uma importante fonte de infecção, sendo denominados portadores renais de *Leptospiras* ¹⁶. A leptospirúria pode ocorrer nos primeiros dias de infecção, antes mesmo dos anticorpos serem detectáveis no soro ¹⁷. O papel dos portadores renais, excretores de *Leptospiras*, responsáveis pela persistência de focos no meio ambiente, é de grande relevância, 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 ¹⁸.

Estudos demonstram que a leptospirose canina está disseminada por todo o território brasileiro, apresentando maior ou menor prevalência dependendo da região estudada. Foram publicados estudos a respeito da soroprevalência de *Leptospira spp.*, que possibilitam a visualização desta situação, como no caso de Botucatu - SP em 2013, Curitiba – Paraná em 2008, Belo Horizonte – Minas Gerais e Monte Negro – Rondônia em 2007, Patos –

Paraíba em 2004, com prevalências de 17,7%, 20%, 27,3%, 13,1% e 32,27% respectivamente ^{19, 20, 21, 22, 10}.

São inúmeros os trabalhos relativos aos aspectos epidemiológicos, sobretudo, prevalência da infecção em diferentes populações caninas como também, os que avaliam aspectos clínicos e patológicos em animais experimentalmente infectados. Porém são poucos os trabalhos em que foram avaliados os parâmetros bioquímicos em cães naturalmente infectados.

O diagnóstico clínico da leptospirose se baseia no histórico, no quadro clínico, incluindo anorexia, prostração, desidratação, icterícia e, nas alterações laboratoriais indicando de comprometimento renal e hepático. Na rotina clínica, o diagnóstico clínico e epidemiológico se confirma pelo isolamento do agente e pela pesquisa de anticorpos específicos no soro, por meio da reação de Soroaglutinação microscópica ³, considerado o teste de referência pela idem anterior Organização Mundial da Saúde ²³.

Exames como o hemograma, dosagem dos valores séricos de uréia e creatinina e urinálise, podem ser utilizadas como exames complementares, pois indicam as alterações funcionais nos diferentes órgãos acometidos, contribuindo assim para a avaliação clínica do animal ²⁴.

O diagnóstico definitivo da leptospirose baseia-se na pesquisa de anticorpos aglutinantes, através da prova de soroaglutinação microscópica com antígenos vivos ou do isolamento do agente (Quadro 1).

Estes métodos, no entanto, não são acessíveis a todos os profissionais veterinários, sendo importantes os dados laboratoriais que possam auxiliar no diagnóstico da leptospirose, facilitando o estabelecimento precoce da terapia indicada para minimizar a disseminação do agente no meio ambiente com o propósito de avaliar os aspectos clínicos da infecção natural em cães, foram estudados, durante dois anos, os casos presuntivos de leptospirose nessa espécie animal, permitindo a caracterização das formas clínicas da doença, a evolução do processo, as variações no hemograma e da bioquímica sanguínea. Dessa forma os autores procuraram caracterizar as alterações bioquímicas séricas em casos de infecção natural de cães por *Leptospiras*, nas suas diferentes formas de manifestação clínica ²⁵.

Quadro 1 - Relação dos sorovares de *Leptospira spp* utilizados como antígenos na reação de Soroaglutinação Microscópica aplicada ao

diagnóstico de leptospirose – São Paulo -2015. A Leptospirose canina tem sido subnotificada em nosso meio, possibilitando assim a manutenção de portadores responsáveis pela manutenção do agente no ambiente. Aliado a isso, as condições precárias em que vive boa parte da população nos grandes centros urbanos, mais especificamente em São Paulo, contribui para a ocorrência da doença em humanos. Neste trabalho, utilizamos amostras de soro oriundas de campanhas de castração na região sul da cidade de São Paulo e HOVET-UNISA, reagentes para *Leptospira* spp. Nessas amostras, são avaliadas as funções renal e hepática com o intuito de avaliar se os animais portadores revelam alterações bioquímicas que possam auxiliar o clínico de pequenos animais no diagnóstico diferencial e na solicitação de exames sorológicos que identifiquem a presença da bactéria, permitindo assim a tomada de medidas de prevenção e controle dessa importante zoonose.

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

2. Revisão de literatura

A *Leptospira* é uma bactéria da ordem Spirochaetales, da família *Leptospiraceae* e gênero *Leptospira*. A bactéria possui uma forma helicoidal, flexível e com 0,1 e 0,2 µm de diâmetro e 6 a 12 µm de comprimento. A parede celular é típica de bactérias gram-negativas, apresentando envoltório externo e rico em mucopeptídeo e lipopolissacarídeos que determina, dependendo do sorovar. A *Leptospira* tem como base uma diferenciação antigênica no qual cada sorovar é a unidade taxonômica básica do gênero. Sorovares com antígenos comuns são do mesmo sorogrupo. Há cerca de 24 sorogrupos conhecidos e estudados, contendo aproximadamente 250 sorovares. Cada espécie de *Leptospira* tem uma alteração taxonômica. São conhecidas 20 espécies de *Leptospiras* por homologia de DNA, e em cada espécie existem vários sorovares. As espécies são classificadas como: Não patogênicas, intermediárias e patogênicas²⁶, como mostra o quadro abaixo.

Quadro 2 - Classificação das *Leptospiras* e suas formas de patogenicidade, separadas em: não patogênicas, patogênicas e intermediárias.

Espécies não patogênicas	Espécies intermediárias	Espécies patogênicas
<i>L. biflexa</i>	<i>L. licerasiae</i>	<i>L. alexanderi</i>

Espécies não patogênicas	Espécies intermedíarias	Espécies patogênicas
<i>L. vanthielli</i>	<i>L. wolffii</i>	<i>L. weilli</i>
<i>L. walbachii</i>	<i>L. fainei</i>	<i>L. borgpetersenii</i>
<i>L. terpstrae</i>	<i>L. inadai</i>	<i>L. santarosai</i>
<i>L. meyeri</i>	<i>L. broomii</i>	<i>L. kmetyl</i>
<i>L. yanagawae</i>	-	<i>L. alstonii</i>
<i>L. idonii</i>	-	<i>L. interrogans</i>
-	-	<i>L. kirschneri</i>
-	-	<i>L. noguchii</i>

Fonte: Adaptado de LEVETT (2015) ²⁷

As *Leptospiras* não resistem à dessecação, luz solar direta e ao aquecimento a 60°C, pH ácido ou alcalino. Porém são resistentes à água parada com o pH neutro e sobrevivem por até um ano nesta condição, em solo úmido sobrevivem por meses e ao frio e congelamento por 100 dias a -20°C ²⁶.

Em cães, a leptospirose é uma doença infecciosa aguda de início abrupto, cujas manifestações clínicas podem variar de quadros assintomáticos ou oligossintomáticos, leve e de evolução benigna até formas graves, com alta letalidade. As duas formas mais observadas nos cães são a hepatonefrítica, causada pelo sorovar *icterohaemorrhagiae* que leva a comprometimento hepático e renal ²⁸, e a forma nefrítica causada pelo sorovar *canicola* que ocasiona comprometimento renal, porém nas formas de evolução benigna ocorre nefrite intersticial crônica com eliminação de *Leptospira* por longos períodos de tempo ²⁹.

A aderência das *Leptospiras* à membranas celulares pode ser relacionada a persistência da *Leptospira* nos rins, sendo intensificada pela presença de anticorpos específicos ²⁹.

Os lipopolissacarídeos da *Leptospira* são semelhantes aos de bactérias gram-negativas, porém a toxicidade da *Leptospira* é muito maior. A fração glicoproteica (GLP), é diretamente citotóxica, induzindo assim ao extravasamento do conteúdo da célula e a morte celular ³¹. A infecção ocorre através das mucosas dos olhos, boca, trato intestinal ou nariz, o período de

leptospiremia, que dura aproximadamente uma semana, começa em até dois dias após o animal ser infectado. Durante o período de leptospiremia, a *Leptospira* pode ser isolada a partir do sangue³².

Segundo LEVETT (2001)³, a maior parte das infecções causadas pela *Leptospira*, são subclínicas. Uma menor proporção das infecções apresentam sinais clínicos da doença, como febre repentina, mialgia, dor abdominal e menos comum, prurido em pele. A síndrome não icterica da doença dura aproximadamente uma semana e resulta no aparecimentos de anticorpos.

Os sinais clínicos aparecem quando a doença está em sua primeira fase, na fase de leptospiremia e geralmente apresenta-se como um quadro agudo. O sorogrupo *pomona* e *icterohaemorrhagiae* causam doença hemolítica, hemoglobinúria, icterícia e morte. Também há o comprometimento renal, que é uma característica importante da doença, principalmente causado pelo sorogrupo *canicola*. O lipopolissacarídeo das *Leptospiras*, além da toxicidade direta, pode também induzir a produção de citocinas, principalmente a TNF-alfa, que participam como mediadores da síndrome da resposta inflamatória sistêmica.

Depois da entrada da bactéria no organismo, por mucosas intactas ou lesadas, acontece a leptospiremia, onde a bactéria multiplica-se no endotélio dos vasos, sistema linfático, liquor, rim, fígado, pulmões, baço, olhos, trato genitourinário e sistema nervoso central. O período de incubação ocorre aproximadamente de 5 a 10 dias. A resposta humoral do animal ocorre cerca de 7 dias depois da entrada da bactéria, promove assim o clearance das *Leptospiras* no organismo. Nos rins, a bactéria permanece nas células dos túbulos renais, local onde não há resposta humoral adequada. A *Leptospira* é eliminada pela urina durante várias semanas, ocorrendo assim a leptospiúria, pode se manter durante meses em animais domésticos²⁷.

A vasculopatia sistêmica é um sinal importante da leptospirose, acometendo principalmente pequenos vasos e causa lesão multissistêmica, extravasando líquido intravascular para o interstício, junto com êmese e diarreia, podendo ocorrer o choque hipovolêmico. As hemorragias podem ser decorrentes do agravamento da lesão³⁰. Segundo Hagiwara et al (2004)³³, testes de avaliação bioquímica que mostrem alteração de função renal e hepática, permitem uma rápida avaliação e diagnóstico da leptospirose,

quando o animal apresentar alterações típicas da doença, facilitando o prognóstico.

Outros achados são hipoalbuminemia, aumento das globulinas e diminuição da produção de fatores de coagulação³⁰. A insuficiência renal, é resultante de uma lesão tubular por hipóxia decorrente de isquemia, e normalmente ocorre na ausência da inflamação. A isquemia ocorre decorrente à hipovolemia e hipotensão, resultante de desidratação³¹. Após o surgimento dos anticorpos, as *Leptospiras* podem ser encontradas principalmente nos túbulos renais¹⁸.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Tendo em vista a importância da leptospirose canina na saúde pública, o objetivo deste trabalho foi avaliar a função hepática e renal de amostras de soro de cães reagentes para leptospirose a fim de verificar os sorovares que causam alterações no fígado e rins desses animais.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a função renal através da determinação de ureia e creatinina no soro de cães reagentes para pelo menos um dos sorovares de *Leptospiras* spp.
- Avaliar a função hepática através da determinação de proteína, total, albumina, globulinas, alanina amino transferase e fosfatase alcalina do soro de cães reagentes para pelo menos um dos sorovares de *Leptospiras* spp.
- Comparar os resultados obtidos na avaliação das funções hepática e renal de cães reagentes a diferentes sorovares.

4. Material e Métodos

4.1 Amostras

As amostras utilizadas neste trabalho foram coletadas entre agosto de 2015 à maio de 2016. Foram obtidas informações do animal e proprietário,

assim como um questionário (Anexo 1) e o consentimento do proprietário para a coleta da amostra e a realização dos testes (Anexo 2).

O soro de cães reagentes para Leptospirose utilizado nas análises bioquímicas foi obtido de amostras positivas, previamente testadas através da prova de soroprecipitação microscópica (SAM) culturas de antígenos vivos constituídos por 24 sorovares de *Leptospira*, nos projetos elencados a seguir: “Estudo da soroprevalências e dos fatores de risco envolvidos na ocorrência de leptospirose canina dos animais atendidos em campanha de controle populacional em área do município de São Paulo”; “Prevalência e fatores de risco associados à leptospirose canina no extremo sul do município de São Paulo” e, “Leptospirose em cães atendidos no Programa de Controle Populacional Animal: inquérito sorológico, fatores de risco e confirmação da infecção por isolamento e PCR”, todos coordenados pela Prof. Dra. Amare Paldês Gonçalves e devidamente registrados no CEUA da UNISA (Anexo 3).

Estas alíquotas de soro, aproximadamente 500 µL, foram acondicionadas em tubos do tipo eppendorf e congeladas (-20°C) até a realização dos testes.

Foram realizadas as seguintes determinações bioquímicas: para a determinação da atividade sérica de alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), e dos níveis séricos de ureia, creatinina, proteína total, albumina e globulinas.

4.2 Metodologia de Análise

Os exames foram processados no analisador semi-automático de bioquímica – BIO 200F® da Bioplus.

Ureia: a ureia sanguínea foi determinada por reação cinética enzimática ultravioleta no analisador semi automático em comprimento de onda de 340 nm, utilizando o kit reagente Uréia UV liquiform Vet ® - Labtest Diagnostica SA.

Creatinina: para a dosagem de creatinina foi utilizado o método da reação do picrato alcalino, reação cinética de 2 pontos em comprimento de onda de 510 nm, utilizando o kit reagente Creatinina K Vet ® - Labtest Diagnostica SA.

Proteínas Totais: A avaliação de proteínas totais em amostras de sangue é útil para avaliar estado nutricional e alterações protéicas de outras doenças. A metodologia que utilizamos neste ensaio foi a colorimétrica (Método do Biureto) utilizando o kit reagente Proteínas Totais - ® - Labtest Diagnostica SA.

Albumina: Para a determinação dos teores de albumina foi utilizado o teste de verde de bromocresol, reação de ponto final, colorimétrico utilizando o kit reagente Albumina Vet- ® - Labtest Diagnostica SA.

Globulinas: As globulinas foram obtidas pela diferença dos valores de proteínas totais e albumina, sendo o resultado expresso em g/dL.

Fosfatase Alcalina (FA): Para a determinação da Fosfatase Alcalina em soro ou plasma, utilizou-se o método cinético de tempo fixo e medição de ponto final. A fosfatase alcalina hidrolisa o p-nitrofenilfosfato que libera o p-nitrofenol e fosfato orgânico. A quantidade produzida de p-nitrofenol é diretamente proporcional à atividade da fosfatase alcalina na amostra em comprimento de onda de 405nm (Bowers e Mc Comb modificado) utilizando o kit reagente Fosfatase Alcalina liquiform Vet - ® - Labtest Diagnostica SA.

Alanina amino transferase (ALT) : Utilizou-se a metodologia cinética UV-IFCC. A ALT catalisa a transferência do grupo amina da alanina para o cetoglutarato, com formação de glumato e piruvato. O piruvato é reduzido à lactato por ação do lactato desidrogenase (LDH), enquanto que a coenzima NADH é oxidada a NAD. A redução da absorbância de 340 nm, consequente à oxidação da coenzima NADH, é monitorada fotometricamente, sendo diretamente proporcional à atividade da ALT na amostra. Metodologia : Cinética UV- IFCC utilizando o kit reagente ALT/GPT liquiform Vet - ® - Labtest Diagnostica SA.

4.3. Forma de análise dos resultados

Os resultados dos parâmetros obtidos na avaliação das funções hepática e renal foram abordados por meio de análise estatística descritiva.

5. Resultados

Durante o período compreendido entre agosto de 2015 e maio de 2016 foram coletadas 422 amostras de soros de cães nas campanhas de castração da Prefeitura de São Paulo, realizadas na Zona Sul e Hovet UNISA amostras de soro de cães que foram submetidas à Prova de SAM para detecção de amostras reagentes a um ou mais sorotipos de *Leptospira*. Dessas, 49 animais foram reagentes e as alíquotas dessas foram encaminhadas ao Laboratório de Análises Clínicas Veterinário do HOVET UNISA para a avaliação da função renal e hepática.

Os valores médios e desvios padrão de ureia e creatinina, independente do sorotipo e do título de anticorpos foram de 28,34 mg/dL \pm 5,59 e 1,04 \pm 0,36 respectivamente. Esses resultados quando comparados aos valores de referência para a espécie de 21,4 – 64,2 mg/dL e 0,5 a 1,4 mg/dL mostraram-se dentro dos valores de normalidade da espécie.

Para a avaliação da função hepática foram realizados os seguintes testes ALT, FA, PT, albumina e globulina. As médias e respectivos desvios-padrão de cada um dos testes acima, bem como os valores de referência de cada um dos testes, independente do tipo de sorovar e título de anticorpos foram os seguintes: ALT: 39,04 U/L \pm 13,92 (21-73 U/L); FA: 64,52 \pm 36,23 (20 – 156 U/L); PT: 6,09 g/dL \pm 0,70 (5,4 - 7,1 g/dL); Albumina: 2,71 g/dL \pm 0,32 (2,6 – 3,3 g/dL) e Globulinas: 3,34 g/dL \pm 0,74 (2,7 - 4,4 g/dL) sendo os valores de normalidade da espécie encontram-se entre parêntesis. Podemos notar que os valores de função hepática desses animais se mantiveram dentro da normalidade.

Em relação aos sorovares de *Leptospira* encontrados, verificou-se que 14 animais foram sororeagentes a dois ou mais sorovares, 33 amostras foram reagentes a um único sorovar e 2 animais apresentaram resultados inconclusivos. A frequência de ocorrência de cada um dos sorovares pesquisados nos animais sororeagentes para *Leptospira* está apresentada na Tabela 1.

Os resultados dos valores médios da função renal (ureia e creatinina) e hepática (ALT, FA, Proteína total, albumina e globulinas) de acordo com o sorovar encontrado esta descrito na tabela 2. Ressalta-se que algumas

amostras de cães foram reagentes a mais de um sorovar. Foram encontrados dois sorogrupos de pomona (13A e 36). Os valores médios, independente do sorovar da amostra, mantiveram-se dentro dos valores de normalidade.

Tabela 1 - Frequência de Ocorrência de sorovares de amostras positivas na prova de SAM para *Leptospira* de cães atendidos em campanhas de controle populacional na Zona Sul do município de São Paulo, 2015-6.

Sorovar	Número sorovares	Frequência de Ocorrência (%)
<i>australis</i>	1	1,2
<i>autumnalis</i>	4	4,9
<i>butembo</i>	2	2,5
<i>bratislava</i>	23	28,4
<i>canicola</i>	4	4,9
<i>cynopteri</i>	3	3,7
<i>copenhageni</i>	13	16,0
<i>guaicura</i>	2	2,5
<i>grippotyphosa</i> ,	4	4,9
<i>icterohaemorrhagiae</i>	9	11,1
<i>Pomona 13A</i>	8	9,9
<i>Pomona 36</i>	8	9,9
Total	81	100,0

Tabela 2 – Valores médios e respectivos desvios padrão de Uréia, Creatinina, ALT, FA, Proteína e frações de acordo com o sorovar e número de amostras reagentes, São Paulo 2015-16.

Sorovar	Número de amostras	Ureia (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	ALT (U/L)	FA (U/L)	Proteína total (g/dL)	Albumina (g/dL)	Globulina (g/dL)
<i>australis</i>	1	26,80±0,0	0,87±0,0	21,20±0,0	24,00±0,0	6,70±0,0	3,10±0,0	3,60±0,0

<i>autumnalis</i>	4	26,95± 7,4	1,21±0 ,1	30,20± 7,6	80,18± 38,2	5,58± 0,3	2,58±0 ,2	3,00±0 ,4
<i>bratislava</i>	2	28,15± 5,0	1,22±0 ,2	26,75± 0,9	81,95± 5,6	6,05± 0,2	2,80±0 ,4	3,25±0 ,2
<i>butembo</i>	23	29,49± 5,8	1,06±0 ,4	38,45± 11,3	63,34± 36,5	5,93± 0,5	2,61±0 ,3	3,33±0 ,7
<i>canicola</i>	4	30,53± 3,7	1,10±0 ,3	37,08± 9,1	56,10± 43,3	6,93± 1,4	2,60±0 ,5	4,08±1 ,1
<i>cynopteri</i>	3	29,13± 2,8	1,08±0 ,4	35,70± 9,9	33,53± 8,7	6,07± 0,4	2,57±0 ,2	3,50±0 ,5
<i>copenhageni</i>	13	27,60± 4,2	1,15±0 ,2	35,59± 12,8	72,95± 33,9	6,14± 0,7	2,72±0 ,3	3,42±0 ,7
<i>guaicura</i>	2	19,15± 1,6	1,01±0 ,2	29,15± 11,7	81,85± 22,0	6,00± 0,4	2,50±0 ,3	3,50±0 ,7
<i>grippotyphosa</i>	4	24,50± 3,4	1,07±0 ,2	36,85± 14,5	74,83± 65,2	6,20± 0,5	2,45±0 ,2	3,75±0 ,7
<i>icterohaemorrhagiae</i>	9	27,62± 7,2	1,09±0 ,3	34,67± 12,1	86,86± 34,7	6,07± 0,8	2,71±0 ,3	3,36±0 ,8
<i>pomona 13a</i>	8	28,80± 6,5	1,25±0 ,5	39,81± 9,3	75,01± 49,4	5,88± 0,4	2,58±0 ,2	3,30±0 ,5
<i>pomona 36</i>	8	31,00± 6,3	1,09±0 ,6	41,39± 15,4	70,75± 41,0	5,78± 0,4	2,83±0 ,3	2,95±0 ,5

6. Discussão

Neste presente trabalho, os sorovares com maior incidência em cães foram respectivamente : *butembo*, *copenhageni* e *icterohaemorrhagiae*. Segundo GÍRIO(1993)¹⁴, o sorotipo *icterohaemorrhagiae*, na maioria das vezes, causa a síndrome icterico-hemorrágico, contudo, os cães que apresentaram este sorotipo estavam hígidos, não apresentaram icterícia e não apresentaram alterações laboratoriais que seriam típicas de um caso agudo de leptospirose, como o aumento da ALT, FA e hipoalbuminemia. A gravidade da doença é influenciada pela idade do animal, virulência do sorovar, órgãos e sistemas atingidos, grau da exposição, status vacinal e pela resposta imune do hospedeiro¹⁵. Segundo KOGIKA et al(1987)²⁵, alguns autores procuraram caracterizar as alterações bioquímicas sérica em casos de infecção natural de cães por *Leptospiras* assim como este trabalho, porém de acordo com os resultados obtidos no presente estudo, não foram observadas nenhuma alteração renal e hepática em cães infectados naturalmente.

Nos animais acometidos com o sorotipo *canicola* ocorre um quadro clínico de nefrite e gastroenterite, e em alguns casos, a infecção é assintomática nos cães. Quando ocorrem alterações renais, o animal apresenta sinais clínicos importantes, como uremia, insuficiência renal, enterite hemorrágica, coma e morte¹⁴. Nenhuma alteração renal foi observada no presente trabalho, sendo assim, os testes, não têm valor na detecção dos animais sororreagentes, sendo indispensável o diagnóstico prescrito pela Organização Mundial da Saúde, a soroaglutinação microscópica.

Alguns animais com as vacinas atualizadas, sendo assim, estes foram capazes de produzir anticorpos aglutinantes detectáveis pela soroaglutinação

microscópica (SAM). Pode ocorrer uma reação cruzada entre os sorotipos de um mesmo sorogrupo e os títulos a 1:1250³².

O sorovar com maior prevalência neste grupo de animais, foi o *butembo* (46,9 %), que tem como hospedeiros naturais animais silvestres³⁴. Lembrando que o sorovar *butembo* não está presente na imunização para leptospirose, logo não ocorreu a detecção de anticorpos da vacinação destes animais. Segundo HAGIWARA (2003)¹³, a ocorrência de diferentes tipos de sorovares de *Leptospira*, depende de hospedeiros naturais existentes no ambiente em que o hospedeiro acidental vive. Assim, é preciso que se façam outras pesquisas no sentido de detectar o elo da cadeia que está infectando os cães por este sorovar.

7. Conclusão

Animais infectados naturalmente por *Leptospira*, não mostram alterações que possam ser detectadas em exames de função renal e hepática utilizados de forma corriqueira na prática clínica..

Referências

1. Acha, PN; Szyfres, B. Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales. Organizacion Panamericana de La Salud. 3. ed. Washington, 2003. (Publicación Científica, 580).
2. Faine, S.; Adler, B.; Bolin, C.; Perolat, P. *Leptospira* and leptospirosis. ed. Melbourne: Australia, MediSci, 1999. 272 p.
- 3 Levett, PN. Leptospirosis. *Clinical Microbiology reviews*, 2001, v. 14, n.2, p. 296-326.
4. Quinn, PJ.; Markey, BK.; Carter, ME.; Donnelly, WJ.; Leonard, FC. *Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas*, Porto Alegre: Artmed, 2005. 512 p. THRUSFIELD, M. *Epidemiologia Veterinária*, São Paulo: Editora Roca, 2004. 556 p.
5. Côrtes, JA. *Epidemiologia: conceitos e princípios fundamentais*. São Paulo: Livraria Varela, 1993. 227 p.
6. Paula, EV. Lebarceptospirose 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.
7. Barcellos, C.; Quitério, L. A. A. Vigilância ambiental em saúde e sua implantação no Sistema único de Saúde. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, 2006, v.40, n.1, p.170-171.
8. Souza, LA.; Viana, RCA.; Michalick, MSM.; Reis, JKP.; Lage, AP. Prevalência de infecção por *Brucella canis* em Belo horizonte, Mg. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 2002, v.24, n.3.
9. Bergler, R. *Man and dog: the psychology of a relationship*. Boston: Blackwell Scientific Publications, 1988, p.188.
10. Batista, C. S. C.; Azevedo, S. S.; Alves, C. J.; Vasconcellos, S.A.; 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*, 2004, v. 41, n. 2, p. 131-136.
11. GLEAN. Global Leptospirosis Environmental Action Network. *Meeting Report*. In: 3rd Meeting, Mar 12-14. Brasilia, Brasil, 2013.

12. 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, 2013, 143 p.
13. Hagiwara, MK. Boletim Técnico Pfizer Saúde Animal. Leptospirose Canina. 2003, p.1-6.
14. Gírio, RJS. Abordagem clínica da leptospirose animal. ENCONTRO NACIONAL EM LEPTOSPIROSE. 3., Rio de Janeiro, Anais... 1993,157p.
15. Sykes, JE., Hartmann, K, Lunn, K. F. et al. 2010 ACVIM Small animal consensus statement on leptospirosis: diagnosis, epidemiology, treatment, and prevention. Journal of Veterinary Internal Medicine. 2011, v. 25, p 1-13.
16. Vasconcellos, S. A. O papel dos reservatórios na manutenção da leptospirose na natureza. Comunicações Científicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo,1987, v. 11, n. 1, p. 17-24.
17. Bal, AE.; Gravekamp, C; Hartskeerl, RA.; DE MEZA-BREWSTER, J.; KORVER, H.; TERPSTRA, W.J. Detection of *leptospiras* in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. Journal of Clinical Microbiology,1994, v.32, n.8, p. 1894-1898.
18. Vasconcellos, SA. Leptospirose animal. In: ENCONTRO NACIONAL EM LEPTOSPIROSE,1993, Rio de Janeiro. Anais...Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Nacional de Saúde, 1993, p. 62-65.
19. Langoni, H.; Silva, AV.; Segismundo, R.; Lucheis, SB.; Paes, AC. Variáveis epidemiológicas e alterações clínicas, hematológicas e urinárias em cães sororreagentes para *Leptospira* spp. Semina: Ciências agrárias, Londrina, 2013. v. 34, n. 2, p. 765-776.
20. Tesserolli, GL.; Alberti, JVA.; Bergamaschi, C.; Fayzano, L.; Agottani, JVB. Principais sorovares de leptospirose canina em Curitiba, Paraná. PUBVET, 2008, v. 2, n. 21.
21. Aguiar, DM.; Cavalcante, GT.; Marvulo, MFV; Silva, JCR.; Pinter, A.; Vasconcellos, SA.; Moraes, ZM.; Labruna m. B.; Camargo, LMA.; Gennari, SM. Fatores de risco associados à ocorrência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. Em cães do município de Monte Negro, Rondônia, Amazônia Ocidental Brasileira. Arquivo brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2007, v. 59, n. 1, p. 70-76.

22. Magalhães, DF.; Silva, JA.; Moreira, EC.; Wilke, VML.; Nunes, ABV.; Haddad, JPA.; Meneses, JNC. Perfil dos cães sororreagentes para aglutininas anti-*Leptospira interrogans* em Belo Horizonte, Minas Gerais, 2001/2002. Arquivo brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2007, v. 59, n. 5, p. 1326-1329.
23. WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. 2003. Disponível em: <http://www.who.int/csr/don/en/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.23.pdf>. Acessado em: 21 mar. 2015.
24. Navarro, CEK. & Kociba, G.J. Hemostatis changes in dogs with experimental *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae infection. Am. J. Vet. Res., 1982, v.43, n.5, p.904-906.
25. Kogika, MM; Hagiwara MM; Yasuda HP; Mirandola SMR. Alterações hematológicas na leptospirose canina. Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 1987, [S.l.], v. 24, n. 1, p. 41-46. ISSN 2318-3659.
26. Megid, J.; Ribeiro, GM.; Paes CP. Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia, Rio de Janeiro, capítulo 34, p. 356-358
27. Levett, PN. *Leptospira* and Leptospirosis, Current Topics in Microbiology and Immunology, 2015, v.387, p. 15 -16.
28. Kogika, MM.; Hagiwara, MK. Baccaro, MR. Metastatic calcification in a dog with leptospirosis. Canine Practice, 1992. , v.17, n.4, p.35-38.
29. Masculli, R.; Pinheiro, SR.; Vasconcellos, SA.; Ferreira, F.; Moraes, ZM.; Pinto, CO et al. Inquérito sorológico para leptospirose em cães do município de Santana do Parnaíba, São Paulo, utilizando a campanha de vacinação anti-rábica do ano de 1999. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, 2002, v. 69, n. 2, p. 25-32.
30. Lomar, AV., Diament, D., Torres, JR. Leptospirosis in Latina America. Infect. Dis. Clin. North Am. 14(1):23-39, 2000.
31. Farr, RW. Leptospirosis. Clin. Infect. Dis. 21:1-8, 1995
32. Hathaway SC, ELLIS WA, LITTLE TW, STEVENS AE, FERGUSON HW (1983) *Leptospira interrogans* serovar hardjo in pigs: a new host-parasite relationship in the United Kingdom. Vet Rec 113:153–154

32. WOHL, J.S. Canine leptospirosis. *Comp. Cont. Ed. Pract. Vet.*, 1996, v.18, n.11, p.1215-1241.
33. HAGIWARA, M. K., LUSTOSA, M., KOGIKA, M. M. Leptospirose canina. *Vet News*, 2004, v. XI, n. 67, p. 7-8.
34. LILENBAUM, W. Atualização em leptospiroses bovinas. *Revista Brasileira Medicina Veterinária*, 1996, v.18, n.1, p.9-13.

