

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS**  
**GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**BRUNA DOS SANTOS BISPO**

**LEVANTAMENTO DA LEPTOSPIROSE NOS CÃES ATENDIDOS NO HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO DE MEDICINA VETERINÁRIA- UFRB NO PERÍODO DE 2 MESES**

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA**

**Dezembro – 2019**

**BRUNA DOS SANTOS BISPO**

LEVANTAMENTO DA LEPTOSPIROSE NOS CÃES ATENDIDOS NO HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO DE MEDICINA VETERINÁRIA- UFRB NO PERÍODO DE 2 MESES

Trabalho de conclusão submetido ao Colegiado de Graduação de Medicina Veterinária do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Médico Veterinário.

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Robson Bahia Cerqueira.

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA**

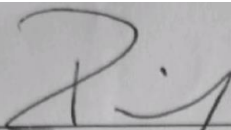
**Dezembro – 2019**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
COLEGIADO DE MEDICINA VETERINÁRIA  
GCCA620 - TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**COMISSÃO EXAMINADORA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

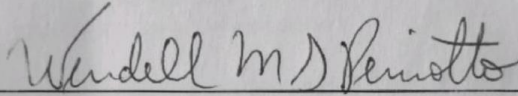
**BRUNA DOS SANTOS BISPO**

**LEVANTAMENTO DA LEPTOSPIROSE NOS CÃES ATENDIDOS NO HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO DE MEDICINA VETERINÁRIA- UFRB NO PERÍODO DE 2  
MESES**



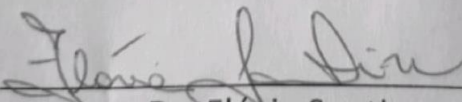
---

Prof. Dr. Robson Bahia Cerqueira  
Orientador  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia



---

Prof. Dr. Wendell Marcelo de Souza Perinotto  
Membro da banca  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia



---

Dr. Flávia Santin  
Membro de banca  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

**Cruz das Almas, BA, 04 de dezembro de 2019**

## DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, por todo apoio e dedicação aos filhos.

## AGRADECIMENTOS

Minha mãe sempre diz que eu sou ótima com as palavras e meu empenho é em nunca decepcioná-la, então escrever esses agradecimentos se tornou um desafio e uma tarefa muito difícil.

Começo agradecendo a Risoneide, porque inegavelmente eu sou a menininha da mamãe, obrigada por todo apoio mãe, obrigada por sempre tentar me dizer a coisa certa, por sempre me incentivar a ser melhor e sempre reconhecer as minhas tentativas.

Agradeço ao meu pai, Jose Robério, por todo amor e confiança que depositou em mim.

Agradeço as minhas irmãs, Brisia e Raizia, por terem sido um exemplo para a caçulinha aqui. E a minha sobrinha, Bella, por me lembrar de quão gratificante será exercer essa profissão ao me dizer “titia, quando eu crescer quero ser veterinária”.

Agradeço a Victor Lucas, meu “namorado”, por ter feito esses cinco anos tão mais fáceis de serem vividos e por ter facilitado tanto a minha graduação.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Robson Bahia Cerqueira, não só por ter aceitado essa difícil tarefa ou por as magnificas aulas que eu tive o prazer de assistir, mas por todos os conselhos extraclasse, por todo o tempo dedicado a aconselhar, por ter ido muito além de sua função.

Agradeço a todos os professores que me ajudaram nessa jornada , me empenharei em deixar florescer a semente de conhecimento que tão gentilmente me deram.

## EPÍGRAFE

“Se você plantar um pessegueiro terá pêssegos, você pode querer uma maçã ou uma laranja, mas mesmo assim terá pêssegos.”

Mestre Oogway

BISPO, Bruna dos Santos, **LEVANTAMENTO DA LEPTOSPIROSE NOS CÃES ATENDIDOS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE MEDICINA VETERINÁRIA-UFRB NO PERÍODO DE 2 MESES**

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2019.

Orientador: Prof. Dr. Robson Bahia Cerqueira

## RESUMO

Investigou-se a ocorrência de leptospirose em cães atendidos na rotina do HUMV-UFRB durante o período de dois meses, independentemente do motivo da consulta, sexo ou idade. Foram examinadas 44 amostras de soro sanguíneo de cães sendo o diagnóstico da leptospirose realizado pela técnica de ELISA indireto, utilizando como antígeno um *pool* de 23 sorovares de *Leptospira* spp. A prevalência encontrada foi de 43 %. Com o objetivo de identificar variáveis individuais e ambientais, associadas a maior frequência de cães soropositivos para *leptospira*, foi aplicado um questionário epidemiológico para verificar variáveis que poderiam estar associadas a infecção. A análise das variáveis apontou como fator de risco para a leptospirose canina o sexo (P- valor = 0.0316), sendo a positividade maior nos cães machos. Outras variáveis estudadas como idade, raça, contato com outros animais, acesso a rua, presença de ratos, exposição a fatores ambientais favoráveis, hábito de mexer no lixo e se é recolhido o resto de comida, não apresentaram diferença significativa. Os cães com sorologia positiva tiram a ficha clínica avaliada buscando sinais clínicos e resultados de exames complementares condizentes com um animal infectado por leptospirose, sendo encontradas alterações condizentes, mas não patognomônico.

**Palavras-chave:** ELISA, Leptospirose.

BISPO, Bruna dos Santos, **PREVALENCE OF LEPTOSPIROSIS IN DOGS ATTENDED AT THE UNIVERSITY HOSPITAL OF VETERINARY MEDICINE-UFRB IN 2 MONTH PERIOD**

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2019.

Orientador: Prof. Dr. Robson Bahia Cerqueira

### **ABSTRACT**

Investigate the occurrence of leptospirosis in dogs treated at the routine of HUMV-UFRB during a period of two months, regardless of the reason for the consultation, gender or age. Forty-four models of dog blood sera were examined and the diagnosis of leptospirosis was performed by the indirect ELISA technique, using as antigen a *pool* of 23 serovars of *Leptospira* spp. The prevalence found was 43%. In order to identify individual variables and environments, most frequently from seropositive dogs for leptospira, an epidemiological questionnaire was applied to verify variables that may be using infection. An analysis of the variables pointed as a risk factor for canine leptospirosis or sex ( $P = \text{value} = 0.0316$ ), being a higher positivity in male dogs. Other variables studied such as age, race, contact with other animals, access to the street, presence of rats, exposure to favorable environmental factors, habit of moving the garbage and whether or not food is collected or different is no different from the difference. Dogs with positive serology draw a clinical chart looking for clinical signs and results of complementary tests conducted with an animal infected with leptospirosis, and these alterations are altered, but not pathognomonic.

**Key words:** Leptospirosis, ELISA.



## LISTA DE TABELAS

Página

**Tabela 1.** Significância ( $\alpha \leq 0,05$ ) da associação das variáveis epidemiológicas e a detecção de anticorpos anti-leptospira ao teste ELISA indireto realizado nos cães atendidos no HUMV- UFRB no período de dois meses.....**34**

**Tabela 2.** Paramentos físicos e exames complementares dos animais submetidos ao teste ELISA indireto.....**36**

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	13
2.1. OBJETIVO GERAL .....	13
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
<b>3. REVISÃO DE LIETRATURA</b> .....	14
3.1. AGENTE ETIOLÓGICO .....	14
3.1.1. Taxonomia .....	14
3.1.2. Características morfofuncionais.....	14
3.1.3. Fatores de Virulência.....	15
3.2. EPIDEMIOLOGIA:.....	16
3.3. TRANSMISSÃO .....	17
3.4. RESPOSTA IMUNE .....	19
3.5. PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS .....	20
3.6. DIAGNÓSTICO .....	21
3.6.1. Diagnóstico Clínico- epidemiológico .....	22
3.6.2. Diagnóstico laboratorial .....	22
3.6.3. Diagnóstico por imagem .....	25
3.6.4. Diagnostico molecular .....	26
3.7. MEDIDAS DE CONTROLE E VACINAS .....	26
3.8. TRATAMENTO.....	27
3.8.1. Terapia específica do tratamento .....	27
3.8.2. Tratamento de suporte .....	28
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	29
4.1. LOCAL DE ESTUDO.....	29
4.2. AMOSTRAS .....	29
4.3. INQUÉRITO EPIDEMIOLÓGICO E EXAMES COMPLEMENTARES .....	30
4.4. ELISA indireto .....	30
4.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	32
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	33
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	40
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	41
ANEXO 1.....	47
ANEXO 2.....	48

## 1. INTRODUÇÃO

A Leptospirose é uma importante zoonose, mundialmente disseminada e de distribuição variada em muitas espécies animais. É causada pela infecção por diferentes sorovares de *Leptospira spp* (GREENE, 2006). A divisão em sorovares e sorogrupos fornece pistas sobre os reservatórios e hospedeiros acidentais envolvidos na transmissão (SCHULLER et al., 2015).

O principal reservatório para manter a transmissão enzoótica, são os roedores (FAINE et al, 1999) , mas os animais domésticos também podem ser reservatórios. Os cães são hospedeiros de manutenção do sorovar *canicola* (LEVETT, 2001), *bataviae*, e possivelmente do *bratislava* (NELSON; COUTO, 2006), sendo hospedeiro acidental dos demais.

A água contaminada é responsável pela disseminação da Leptospirose aos organismos susceptíveis que entram em contato com esta fonte (JOUGLARD; BROD, 2000). Animais que vivem em áreas urbanas, cujas condições sanitárias e de infraestrutura são precárias, onde há lixões, esgotos a céu aberto, depósitos de materiais descartados e restos alimentares que propiciam a presença de roedores, se constituem em população de risco (HAGIWARA, 2003).

A leptospirose nos cães se apresenta com variado polimorfismo clínico, podendo inclusive ser assintomático. Os sinais clínicos dependem da idade e imunidade do hospedeiro, dos fatores ambientais que afetam os microrganismos, da virulência do sorovar infectante e adaptação dele ao hospedeiro, além do sistema afetado (SANTIN et al., 2006). Provas laboratoriais como hemograma, dosagem dos valores séricos de ureia e creatinina e urinálise podem ser utilizados como exames complementares, pois indicam alterações funcionais nos diferentes órgãos acometidos, contribuindo assim para a avaliação clínica do animal (NAVARRO; KOCIBA, 1982).

Devido a sua alta especificidade o Teste de aglutinação microscópica é estabelecido como padrão ouro no diagnóstico da leptospirose (BRASIL, 1995). Outros testes

vêm sendo utilizados, inclusive como teste de triagem como é o caso do ensaio imunoenzimático (ELISA), o qual apresentou boa sensibilidade resultando em uma boa alternativa na detecção de anticorpos anti-*Leptospira* em soro de cão (JIMENEZ-COELLO et al., 2008).

Devido à proximidade com os seres humanos e por manter o agente por longo período nos rins, podendo eliminá-lo na urina sem apresentar sinais clínicos, o cão é a principal fonte de infecção para o homem (BATISTA et al., 2004; MAGALHÃES et al., 2006; BENITEZ et al., 2010). Além disso, o cão pode funcionar como sentinela para a presença do agente no meio ambiente. Por esses motivos um levantamento sorológico com comparação de dados epidemiológico e sintomatologia clínica em cães de uma população se torna uma importante ferramenta para a saúde pública

## 2. OBJETIVOS

### 2.1.OBJETIVO GERAL

Detectar a presença de *Leptospiras* nos cães atendidos no hospital universitário de medicina veterinária – UFRB no período de 2 meses

### 2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir o perfil epidemiológico da população investigada; identificando variáveis individuais e ambientais, associadas a maior frequência de cães soropositivos.
- Correlacionar os resultados de exame físico e de exames complementares com a soropositividade dos cães à leptospirose.

### 3. REVISÃO DE LIETRATURA

#### 3.1. AGENTE ETIOLÓGICO

##### 3.1.1. Taxonomia

O agente etiológico da leptospirose é uma bactéria Gram-negativa que pertence à ordem Spirochaetales, família Leptospiraceae e o gênero *Leptospira*. Originalmente, o gênero *Leptospira* foi dividido em duas espécies: *Leptospira interrogans* sensu lato, com cepas patogênicas e *L. biflexa* sensu lato com estirpes saprófitas, não patogênicas. Essas espécies foram ainda subclassificadas em sorovares com base na heterogeneidade estrutural no componente carboidrato do lipopolissacarídeo (LPS) (CÉSPEDES, 2005). Os sorovares relacionados antigênicamente foram então agrupados em sorogrupos. Atualmente, mais de 250 sorovares patogênicos conhecidos foram identificados pertencentes a 24 sorogrupos (KO et al., 2009).

Mais recentemente, as Leptospiras foram classificadas com base em semelhanças genéticas (hibridação do DNA). Definiu-se 20 espécies de *Leptospira*, incluindo 9 patogênicas, 6 saprófitas e 5 intermediárias, e novas espécies estão sendo adicionadas à medida que são descobertas. Infelizmente, a classificação genética de espécies de *Leptospira* não se correlaciona inteiramente com a classificação sorológica, pois os sorovares do mesmo sorogrupo podem pertencer a diferentes espécies genômicas. No entanto, a classificação sorológica ainda é amplamente utilizada por ser importante para investigações clínicas ou epidemiológicas, uma vez que a identificação de sorovares e sorogrupos fornece pistas sobre os reservatórios hospedeiros envolvidos na transmissão (SCHULLER et al., 2015).

##### 3.1.2. Características morfofuncionais

As leptospiras são bactérias Gram-negativas, espiroquetas, espiraladas, flexíveis e altamente móveis, constituídas por um cilindro protoplasmático que se enrola em volta de um filamento axial central, seu envelope externo é composto por lipopolissacarídeos (LPS) e mucopeptídeos antigênicos (GREENE, 2006). São micro-organismos aeróbios estritos; catalase positivas; oxidases negativas; quimiorganotróficas; capazes de utilizar os ácidos graxos de cadeia longa como a

única fonte de carbono e energia; incapazes de metabolizar os açúcares; não necessitam de aminoácidos para o crescimento. (GOMES, 2015). Medem usualmente de 6 a 20 µm de comprimento e de 0,1 a 0,2 µm de diâmetro e apresentando as extremidades em forma de gancho ou interrogação o que o diferencia de outros espiroquetas (FAINE et al., 1999).

### 3.1.3. Fatores de Virulência

As leptospiras possuem membrana dupla e LPS como as demais bactérias Gram negativa, mas com a camada de peptidoglicano aderido a membrana citoplasmática interna e sobreposto pela membrana externa, característica alusiva da arquitetura das bactérias Gram-positivas (ALEXANDER et al., 1972). Além do LPS foram identificados vários fatores de virulência que podem contribuir na patogênese da *Leptospira* são eles a hemolisinas e proteínas da membrana que inclui adesinas.

Os LPSs são compostos por três segmentos ligados covalentemente: lipídeo A, core e antígeno O. A porção do lipídeo A ancora o LPS a membrana externa celular. O core é uma porção polissacarídica que forma uma região intermediária e mais externamente localiza-se o antígeno O, que consiste em grupos polissacarídicos altamente variáveis, sendo considerado o principal agente antigênico dos LPSs das bactérias gram-negativas, a composição do LPS é semelhante ao das outras bactérias Gram negativas, (FAINE et al., 1999), porém apresenta toxicidade inferior (GOMES, 2015).

Hemolisinas são exotoxinas que tem a capacidade de lisar membranas das células, principalmente do endotélio vascular e hemácias. As principais hemolisinas detectados entre os *Leptospira* patogênicos são provenientes de genes que codifiquem esfingomielinases (sph), tendo sido reconhecido pelo menos sete entre os *Leptospira* patogênicos, incluindo uma hemolisina SphH formadora de poros (ADLER; MOCTEZUMA, 2013). O papel das demais esfingomielinase na patogênese ainda não está claro; mas a ausência desses genes nas leptospiras saprófitas (BULACH, 2006) poderia sugerir possíveis funções na virulência ou simplesmente na sobrevivência no ambiente hospedeiro de mamíferos, no qual certos nutrientes essenciais, como por exemplo o ferro, são limitantes (EVANGELISTA; COBURN, 2010).

A proteína de membrana externa mais abundante nas leptospirosas patogênicas é a lipoproteína LipL32 (MALMSTROM et al., 2009), representando 75% do proteoma da membrana externa (CULLEN et al., 2002). Esta proteína é expressa em todas as leptospirosas patogênicas (HAAKE et al., 2004), e está ausente nas saprófitas (PICARDEAU et al., 2008). LipL32 é uma adesina, sendo determinantes mediadores da invasão de patógenos bacterianos. Ela liga-se à laminina colágeno, fibronectina e ao plasminogênio (VIEIRA et al., 2010).

As proteínas Lig (tipo Ig da leptospiral) também são adesinas presentes na membrana externa, LigA e LigB são encontradas em todas as espécies patogênicas de *Leptospira* o que sugere que sejam fatores de virulência, LigC pode ser encontrada em algumas espécies (MATSUNAGA et al., 2003). A proteína LigB possui afinidade com componentes da matriz como fibronectina, fibrinogênio, laminina e elastina, que estão expostas na pele lesionada (CHOY et al., 2007). Choy et al. 2011 demonstraram que segmentos recombinantes de LigB são capazes de inibir parcialmente a formação do tampão de coagulação, por meio da ligação ao fibrinogênio e fibrina o que ajuda o microrganismos a sobreviverem e se disseminarem no hospedeiro (RIVERA et al., 2007).

### 3.2. EPIDEMIOLOGIA:

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial, com uma prevalência que varia consideravelmente entre áreas e entre países sendo mais elevada em regiões tropicais (ACHA ; SZYFRES, 1986). As leptospirosas apresentam pouca resistência ambiental sendo rapidamente destruídas pela desidratação, sensíveis a desinfetantes e inibidas em pH ácido ( BENITEZ et al., 2010), mas os índices pluviométricos das regiões tropicais favorecem enchentes propiciando locais com água estagnada e solo lamacento, isso combinado a um pH levemente alcalino com salinidade baixa e ausência de radiação ultravioleta garantem condições ideais onde as leptospirosas patogênicas conseguem sobreviver por até 6 meses, no entanto, sem se multiplicarem (GOMES, 2015).



Vários inquéritos sorológicos realizados em cães no Brasil retratam a variabilidade da distribuição de sorovares de *Leptospira* spp predominantes nas diferentes localidades. A técnica empregada nos inquéritos é a de soroaglutinação microscópica (SAM), mas variam na quantidade de sorovares testados, dificultando comparação de dados. Avila et al. (1998) em 1995 realizaram testes em 425 cães do Município de Pelotas, Estado do Rio Grande do Sul, dessa população 34,80% foram reatores ocorrendo maior numero de reações para os sorovares *canicola*, *icterohaemorrhagiae* e *copenhageni*. No ano 2000, nessa mesma cidade, Jouglard e Brod (2000) , verificaram uma nova população de 489 cães e obtiveram 2,66% de positividade com prevalências dos sorovares *icterohaemorrhagiae*, *australis*, *copenhageni*, *pyrogenes*, *sentot* e *canicola*.

Alves et al. (2000) encontraram 20% de reatores em 114 cães da cidade de Patos, Estado da Paraíba, com destaque para os sorovares *autumnalis*, *butembo*, *grippotyphosa* e *australis*. Quatro anos depois, Batista et. al.(2004) testaram 130 cães errantes provenientes desta mesma cidade e a prevalência foi mantida em 20%, mas os sorovares de maior frequência foram *autumnalis* , *pomona* , *grippotyphosa* e *patoc*. Também no estado da paraíba, na cidade de Campina Grande, Batista et. al. (2005) investigaram a prevalência de leptospirose em 285 cães, a prevalência encontrada foi de 21,4%, com maior frequência dos sorovares *autumnalis*, *copenhageni* e *canicola*.

A distribuição dos sorovares patogênicos da leptospira pode estar associada com a disponibilidade do hospedeiro de manutenção (BURR; LUNN; YAM, 2009), o que explica a variação geográfica. Em conformidade com isso , Mello e Manhoso (2007) avaliaram aspectos epidemiológicos da leptospirose canina no Brasil e concluíram que a doença apresentou índices variáveis de acordo com o estado e região do país. Os autores também pesquisaram os sorovares predominantes em cães de todos os estados, havendo maior registro para o *Canicola* e *Copenhageni*, seguido pelo *Icterohaemorrhagiae* e *Autumnalis*.

### 3.3. TRANSMISSÃO

A transmissão requer circulação enzoótica contínua do patógeno entre os reservatórios de animais ou, como comumente referido, hospedeiros de manutenção (KO et al., 2009). Os hospedeiros de manutenção são aqueles que apresentam uma redução da resposta sorológica, sutis sinais clínicos e demorado estado de portador renal eliminado muitas bactérias na urina. Os hospedeiros acidentais são aqueles que possuem elevados títulos de anticorpos aglutinantes decorrente de uma grave doença e um reduzido estado de portador renal (GOMES, 2015).

Os animais podem ser hospedeiros de manutenção de alguns sorovares e hospedeiros acidentais de outros, cuja infecção pode causar doenças graves ou fatais. O principal reservatório para manter a transmissão enzoótica, são os roedores (FAINE et al., 1999) , mas os animais domésticos também podem ser reservatórios. Os cães são hospedeiros de manutenção do sorovar *canicola* (LEVETT, 2001), *bataviae*, e possivelmente do *bratislava* (NELSON; COUTO, 2006), sendo hospedeiro acidental dos demais.

A fonte de infecção da leptospira é o animal infectado que pode transmitir a doença direta ou indiretamente. O patógeno é eliminado principalmente através da urina. A urina infectada, devido à relação anatômica dos aparelhos urinário e reprodutor, acaba contaminando o sêmen e secreções vaginais possibilitando a transmissão pela cópula ou inseminação artificial (FAINE et al., 2000). Durante a fase de leptospiremia, o sangue e todas as secreções corporais podem conter leptospiras assim como fetos abortados e as placentas (SCHMITT; JORGENS, 2011). Essas secreções contaminam o ambiente.

A transmissão direta ocorre por exposições de animais susceptíveis à animais contaminados, de forma venéreas ou congênita no momento da gestação por via transplacentária ou no momento do parto pela via genital e também pode ocorrer transmissão pelo aleitamento materno (KO et al., 2009; GOMES, 2015). A transição indireta ocorre por exposição de animais susceptíveis a ambientes contaminados , particularmente durante a temporada de chuva onde enchentes e inundações favorecem a sobrevivência do patógeno (SCHULLER et al., 2015) que utilizam abrasões, cortes na pele e conjuntiva(CÉSPEDES, 2005) inclusive a das vias aéreas(LEVETT, 2001) como portas de entrada .

### 3.4. RESPOSTA IMUNE

Por a leptospira ser um organismo extracelular , o mecanismo de interação com o hospedeiro em uma infecção natural é mediado principalmente pela resposta imune humoral sendo a imunidade adquirida depende da produção de anticorpos e da ativação da via clássica do sistema complemento (KO et al., 2009 ). O sistema imune inato constitui a primeira linha de defesa do hospedeiro, desempenhando papel crucial no reconhecimento e eliminação de leptospiras. O reconhecimento é realizado principalmente por duas famílias de receptores: os receptores semelhantes ao Toll (TLR, do inglês Toll-like receptor) e os receptores semelhantes ao Nod (NLR, do inglês Nodlike receptor) (D'ANDON et al., 2014).

Geralmente o dímero TLR4-TLR4 reconhece o LPS da parede celular de bactérias gram-negativa resultando em uma resposta pró-inflamatória mediada por citocinas e quimiocinas (FERRAZ et al., 2011). Porém, o LPS de leptospira ativa macrófagos humanos através de TLR2 ao invés de TLR4 . Esse reconhecimento diferenciado é atribuído à composição incomum do lipídeo A ( QUE-GEWIRTH et al., 2004) e pode ser uma estratégia da bactéria patogênica para evitar a ativação adequada de células do sistema imune, contribuindo para o estabelecimento da infecção em humanos (PALANIAPPAN; RAMANUJAM; CHANG, 2017 ).

A imunidade adquirida tem grande relevância, uma vez que a dificuldade de fagocitose por neutrófilos e macrófagos sugere que o envelope externo das leptospiras possuem um componente antifagocítico. Sendo a fagocitose efetiva principalmente quando o patógeno encontra-se opsonizado por anticorpos específicos (KO et. al, 2009 ) . Além disso, essa opsonização é capaz de ativar a via clássica do sistema complemento que é um dos mecanismos efetores mais importantes durante as primeiras horas de infecção sendo capaz de intensificar o processo de fagocitose pelas células do sistema imune inato (CRUVINEL et al., 2010). Os anticorpos produzidos durante a infecção por leptospira são direcionados principalmente contra o LPS bacteriano. A imunidade dos anticorpos anti-LPS é limitada aos sorovares homólogos ou intimamente relacionados e não se sabe se a

resposta por anticorpos contra outros antígenos além do LPS também conferem proteção a outros sorovares (LEVETT, 2001).

Quando o LPS de bactérias gram-negativas é reconhecido pelo TLR4 presente em macrófagos ou nas células dendríticas é induzido a expressão de genes para a produção de interferons do tipo I (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ). Os interferons do tipo I produzidos induzem a maturação das células dendríticas, aumenta a atividade humoral dos linfócitos B, induzem a diferenciação dos linfócitos T CD8, recruta linfócitos e monócitos. Além disso, as citocinas inflamatórias liberadas pelas células dendríticas ativam os linfócitos TCD4 a se diferenciarem em linfócitos Th1 (secretam IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\beta$ ) e em linfócitos Th2 (liberam a IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13) (FERRAZ et al., 2011).

Os peptídeos bacterianos da leptospira também podem ser apresentados via MHC de classe I para linfócitos T CD8, isso porque mesmo sendo patógenos extracelular, as leptospiros apresentam um comportamento clássico de patógenos intracelulares, que é a capacidade de escapar do fagolisossomo para o citosol de macrófago onde são reconhecido como endógenos e apresentadas na superfície da célula (FRAGA; BARBOSA; ISAAC, 2011; CRUVINEL et al., 2010). Percebe-se que a resposta do sistema imunológico ao patógeno é feito tanto pela resposta imune humoral, sendo esta mais efetiva, quando pela resposta imune celular, que tem o papel pouco compreendido (FRAGA; BARBOSA; ISAAC, 2011).

### 3.5. PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS

A leptospira penetra na pele lesionada ou nas membranas mucosas dos olhos, nariz e garganta e rapidamente estabelece uma infecção sistêmica, superando as barreiras teciduais e disseminando-se por via hematogêna (BHARTI, 2003). Essa primeira fase é chamada de leptospiremia, tem duração média de 3 a 10 dias, lesiona o endotélio vascular, particularmente os pequenos vasos sanguíneos, levando à isquemia localizada e resultando em lesões em vários órgãos (fígado, baço e rins, principalmente) podendo, quando maciça, resultar em choque e óbito (LANGSTON; HEUTER, 2003; GOMES, 2015). O sorovar *canicola* é adaptado aos

cães, que são seus hospedeiros de manutenção (LEVETT, 2001), os cães infectados tem apresentação subclínica e leptospiúria. Já a infecção causada por o sorovar *icterohaemorrhagiae*, do qual o cão é hospedeiro acidental, caracteriza-se por doença hemorrágica aguda, insuficiência hepática e renal (QUINN et al., 2005).

A extensão dos danos nos órgãos internos varia com a virulência do organismo e a suscetibilidade do hospedeiro. A leptospirose nos cães se apresenta com variado polimorfismo clínico. Os sinais clínicos dependem da idade e imunidade do hospedeiro, dos fatores ambientais que afetam os microrganismos, da virulência do sorovar infectante e adaptação dele ao hospedeiro, além do sistema afetado (SANTIN et. al., 2006). A insuficiência renal progressiva causa anorexia com consequente perda de peso, letargia, depressão, vômito, febre, poliúria, diarreia (nem sempre), dor abdominal por conta da lesão dos rins e uremia que propicia ulcerações na cavidade oral. Icterícia e diminuição dos fatores de coagulação podem ocorrer devido à injúria hepática e petéquias ou ate mesmo coagulação intravascular disseminada em consequência da lesão endotelial (FAINE et. al., 2000; BIESDORF, et. al., 2008).

A presença da bactéria na corrente sanguínea estimula o sistema inume do hospedeiro a produzir anticorpos específicos para o sorovar infectante. Caso ocorra sobrevivência dos microrganismos após resposta imunológica, eles podem alojar-se em órgãos de tropismo como túbulos renais, útero, olhos e meninges (QUINN et al., 2005) onde conseguem escapar do sistema imune (ATHANAZIO et al., 2008). A manutenção do patógeno no epitélio tubular renal caracteriza a fase de leptospirúria em que o agente infeccioso é eliminado na urina do hospedeiro de manutenção de forma intermitente por período que pode se prolongar por anos (ETTINGER; FELDMAN, 2004). Uma explicação para que a resposta imune seja insuficiente para debelar a infecção dos túbulos renais e bexiga é que o aporte sanguíneo nestas regiões é limitado levando á uma menor eficiência das imunoglobulinas nestes locais (FAINE et al., 2000).

### 3.6. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da leptospirose canina deve ser fundamentado nas informações clínico-epidemiológicas e confirmado por exames laboratoriais (ETTINGER; FELDMAN, 2004).

### 3.6.1. Diagnóstico Clínico- epidemiológico

O diagnóstico inicial da leptospirose é realizado com base nos sinais clínicos, avaliação do histórico e contexto epidemiológico (QUINN et al., 2005). Há uma grande diversidade de sinais clínicos em cães, pois esses dependem da idade, imunidade do animal e da virulência do sorovar infectante (ADLER; MOCTEZUMA 2010). As infecções podem ser de forma aguda ou crônica, levando a ocorrência de insuficiência renal aguda, disfunção hepática e diátese hemorrágica, essas doenças podem ser consequências de outras afecções, o que impede que o diagnóstico clínico seja conclusivo (QUINN et al., 2005; ANZAI, 2006 ; BIESDORF, et al., 2008).

### 3.6.2. Diagnóstico laboratorial

#### 3.6.2.1. *Patologia clínica*

As alterações encontradas no hemograma, bioquímica sérica e urinálise não são exclusivas da leptospirose, porém auxiliam o clínico a avaliar o estado do paciente e definir o melhor tratamento. Apesar de algumas alterações serem consideradas “clássicas” na leptospirose, é importante lembrar que resultados normais não excluem a doença.

As alterações hematológicas observadas nos casos de leptospirose usualmente são leucocitose por neutrofilia e graus variáveis de anemia (ETTINGER; FELDMAN, 2004). A leucopenia pode ser um achado na fase inicial da infecção (leptospiremia) devido a intenso recrutamento das células polimorfonucleares pelos tecidos, evoluindo geralmente para leucocitose com desvio a esquerda, com a progressão da doença. A anemia pode variar de regenerativa, por provável perda de sangue ou hemólise, a anemia arregenerativa, devido à doença renal ou hepática crônica. Também podem ocorrer hipofibrinogenemia e trombocitopenia, decorrente das anormalidades de coagulação ou coagulação intravascular disseminada. (LANGSTON; HEUTER, 2003; LAPPIN, 2006).

Os resultados da bioquímica sérica indicam comprometimento renal e hepático. A função hepática é avaliada mediante testes enzimáticos capazes de detectar a lesão nos hepatócitos ou através de testes funcionais que analisam substâncias produzidas pelo fígado, como a albumina e substâncias que dependem de excreção ou processamento metabólico como bilirrubinas (LASSEN, 2004). A alanina aminotransferase (ALT), a aspartato aminotransferase (AST), a fosfatase alcalina (FA) e a gama glutamiltransferase (GGT) são as principais enzimas utilizadas para avaliação hepática (HARTSKEERL et al., 1996).

Tanto a elevação sérica de AST quanto a de ALT está relacionada com a lesão de hepatócitos, no entanto a avaliação da ALT é mais sugestiva para injúria hepática por essa enzima ter suas maiores concentrações no fígado (LASSEN, 2004; LOPES; BIONDO; SANTOS, 2007). A FA e GGT são sugestivas de colestase (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 1997). Nos cães a GGT apresenta-se em baixas concentrações, sendo a FA preferencialmente utilizada (LOPES; BIONDO; SANTOS, 2007) pelo marcante aumento observado em necrose hepática (LASSEN, 2004).

Em animais acometidos por leptospirose o aumento da bilirrubina sérica é causado devido ao processo inflamatório ou fibrose no fígado que comprimem os hepatócitos levando obstrução intrahepática que comprometem a excreção da bilirrubina mesmo já estando conjugada (BUSH et al., 1994). O fígado é o único órgão responsável pela síntese da albumina, que corresponde a 35-50% do total de proteínas séricas (LOPES; BIONDO; SANTOS, 2007), portanto a diminuição das proteínas totais devido a diminuição da albumina também pode indicar problemas hepáticos .

A bioquímica sérica de cães com leptospirose revela frequentemente aumento dos níveis séricos de ureia e creatinina, variando segundo o grau de comprometimento renal (MILLER et al., 2007). . Um discreto aumento nos níveis de ureia não significa insuficiência renal, somente valores acima de 100 a 120 mg/dL são significativos , isso porque a ureia é um mecanismo de excreção da amônia, que por sua vez tem nas proteína sua principal fonte. Sendo assim, um aumento no catabolismo proteico pode ocasionar aumento na ureia. Já a creatinina é sintetizada no fígado, rins e pâncreas e armazenada no musculo na forma de fosfocreatina, sendo liberada no processo de contração muscular. Por ter produção endógena, sofre menos

influência de fatores exógenos e sua depuração é considerada um indicador confiável da taxa de filtração do glomérulo renal. Assim, alta concentração de creatinina no sangue indica deficiência na função renal por sinalizar deficiência na excreção (BUSH et al., 1994).

A lesão renal aguda na leptospirose pode ainda ser avaliada por meio da urinálise onde observa - se geralmente: densidade baixa, glicosúria, proteinúria, bilirrubinúria, que normalmente precede hiperbilirrubinemia, acompanhadas de presença de cilindros granulosos, e elevação de leucócitos e eritrócitos no sedimento urinário (LANGSTON; HEUTER, 2003 ). Na insuficiência renal aguda, pode ocorrer glicosúria normoglicêmica devido à presença de lesões tubulares significativas (COWGILL; ELLIOT, 2004).

#### 3.6.2.2. *Teste de aglutinação microscópica (MAT)*

O teste de aglutinação microscópica (MAT) é o teste sorológico padrão usado para o diagnóstico de leptospirose. As diluições seriadas dos soros são misturadas com os organismos leptospirais e a maior diluição que aglutina 50% dos organismos é registrada (PICARDERAU, 2013). Um aumento de quatro vezes ou maior, em amostras pareadas, na MAT é altamente sugestivo de leptospirose (SCHULLER S., et al., 2015 ). Se não for feito amostras pareadas, um título MAT de  $\geq 400$  na presença de sinais clínicos e histórico epidemiológico compatível é indicativo de infecção atual (FAINE et al., 1999).

Este teste é baseado na resposta imune do hospedeiro e é um pouco específico para sorovar. Tanto os anticorpos IgM quanto os IgG aglutinam leptospiras, mas o MAT segue mais de perto os títulos de IgM (LANGSTON; HEUTER 2003 ). O título mais alto é considerado o sorovar infectante, com títulos positivos mais baixos considerados reatividade cruzada ,sendo que o MAT não prediz com segurança o sorogrupo infectante em animais com infecção aguda (MILLER et al., 2011 ) e não discrimina entre anticorpos resultantes de infecção ou vacinação (ADLER; MOCTEZUMA, 2010 ). O teste requer microscopia de campo escuro, e o laboratório deve manter culturas dos vários sorovares testados. Portanto, esse teste geralmente é encaminhado para um laboratório comercial.



### 3.6.2.3. ELISA indireto

O ELISA é um teste facilmente padronizado, tecnicamente mais vantajoso que o MAT e usa uma preparação antigênica que pode ser preparada rotineiramente em grandes quantidades (RIBOTTA et al., 2000). O ELISA detecta anticorpos da classe IgM, que reagem com um antígeno específico do gênero amplamente reativo e, portanto, não é adequado para a identificação do sorovar ou sorogrupo causador (MUSSO; LA SCOLA, 2013). Os títulos de IgM aumentam dentro de 1 semana após a infecção e atingem o pico aos 14 dias após a infecção, enquanto os títulos de IgG não estão presentes até 2 a 3 semanas após a infecção e atingem o pico em 1 mês. Sendo assim um título alto de IgM sugeriria infecção aguda (LANGSTON; HEUTER 2003 ). Apesar de não ser específico para cada sorovar, o ELISA é suficientemente sensível para ser usado como um teste de triagem inicial para a detecção de anticorpos leptospirais em soros caninos, com subsequente confirmação de resultados positivos com o MAT (RIBOTTA et al., 2000). Souza et al. (2019) testaram e padronizaram um teste ELISA, utilizando como antígeno o sobrenadante obtido da centrifugação de um pool de 23 sorovares inativados de *Leptospira* spp. Nesse teste o ELISA apresentou sensibilidade de 95,12% e especificidade de 92,68 %.

### 3.6.3. Diagnóstico por imagem

Forrest et al (1998) revisaram retrospectivamente exames de ultrassonografia abdominal de 20 cães com leptospirose confirmada, avaliando as alterações renais. Os achados revelados foram aumento de volume renal, aumento da ecogenicidade do córtex renal, acúmulo de líquido na região perirrenal, pielectasia discreta e faixas de ecogenicidade aumentada na região medular dos rins. As faixas de ecogenicidade aumentadas na região, na vivencia dos autores, só foi observada em cães com leptospirose e, portanto, pode ser um sinal ultrassonográfico específico para essa doença. Outras alterações encontradas ao realizar ultrassonografia abdominal em animais com diagnóstico sorológico confirmado para leptospirose foram: aumento e hipoecogenicidade do pâncreas, espessamento gástrico e, menos comumente, da parede intestinal. Esplenomegalia com ecotextura mosqueada, e discreto aumento de linfonodos abdominais (SYKES et al., 2011).

Em radiografias torácicas de cães com leptospirose é possível observar, nos pulmões, padrões que vão de intersticiais nodulares a alveolares mais graves. Esse padrão pulmonar está associado à hemorragia pulmonar, provavelmente devido à lesão endotelial e vasculite. O envolvimento pulmonar representa uma complicação grave, causando aumento da fatalidade dos casos, dependendo da gravidade do desconforto respiratório (KOHN et al., 2010; BAUMANN; FLUCKIGER, 2001).

#### 3.6.4. Diagnóstico molecular

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método *in vitro* para amplificar seletivamente uma sequência de DNA alvo-específica (MÉRIEN et al., 1992). Vários pares de oligonucleotídeos iniciadores para detecção das leptospirosas patogênicas por PCR foram descritos (LEVETT, 2001). A PCR é um método mais sensível no diagnóstico precoce e crônico, pois são capazes de detectar leptospirosas no sangue, antes que os anticorpos sejam detectados (MUSSO; LA SCOLA, 2013). A limitação do diagnóstico da leptospirose baseado em PCR é a incapacidade da maioria dos testes em identificar o sorovar infectante. Apesar de isto não ser importante para o manejo individual do paciente, a identificação do sorovar tem valor significativo epidemiológico e de saúde pública (LEVETT, 2001).

### 3.7. MEDIDAS DE CONTROLE E VACINAS

A profilaxia é realizada por meio de um programa de vacinação efetivo, lembrando que a imunidade produzida contra a bactéria perdura de seis a oito meses, devendo-se fazer a revacinação anual; porém deve-se vacinar os cães que podem entrar em contato com a bactéria com maior frequência, a cada seis meses. A imunização é eficaz em reduzir a prevalência e a gravidade da leptospirose canina, mas não evita o estado de carreador, nem protege contra a infecção por outros sorotipos que não estão contidos na preparação vacinal (JESUS, 2009).

As vacinas disponíveis atualmente no mercado brasileiro caracterizam-se por serem provenientes de culturas de leptospirosas inativadas acrescidas de adjuvantes compostas pelos sorovares mais prevalentes em estudos efetuados no país. Para os cães encontram-se disponíveis vacinas polivalentes como a óctupla (V8) composta

por dois sorovares (Icterohaemorrhagiae e Canicola), déctupla (V10) com quatro sorovares (Icterohaemorrhagiae, Canicola, Grippotyphosa e Pomona), undéctupla (V11) com cinco sorovares (com o sorovar Conpenhageni a mais que a V10) e a V12 (acrescido pelos sorovares Hardjo e Pyrogenes em relação à V11). (CASTRO et al., 2010).

Além da vacina, o manejo sanitário pode reduzir a chance de contaminação dos animais. Fazer controle dos roedores; monitorar, tratar e separar os cães infectados; limpar o ambiente e limitar o acesso dos cães a áreas alagadiças, pastagens altamente irrigadas, principalmente nos períodos de maior precipitação pluviométrica, são medidas essenciais para reduzir as chances de contaminação dos animais (HAGIWARA, 2003).

### 3.8. TRATAMENTO

O tratamento de um cão com leptospirose consiste em duas componentes principais, a terapia de suporte e a terapia específica (LANGSTON; HEUTER, 2003).

#### 3.8.1. Terapia específica do tratamento

A terapia antibiótica é dividida em duas fases, sendo a primeira direcionada para eliminar a bactéria da circulação sanguínea e a segunda para impedir a fase leptospirúrica, contribuindo para que o animal não se torne um disseminador da doença através da sua urina ( LANÇA, 2012) .Altas doses de penicilina, ampicilina e amoxicilina podem finalizar a fase da leptospiremia. A bacteremia geralmente é reduzida poucas horas após a administração do medicamento. A administração precoce inibe a multiplicação bacteriana, o que diminui o dano a órgãos como o fígado e os rins (LANGSTON; HEUTER, 2003).

A penicilina e seus derivados são os antibióticos de escolha na terapia inicial ( GREENE, 2006). , mas a doxiciclina também é eficaz na eliminação da leptospiremia. A doxiciclina pode ser usada em pacientes com insuficiência renal, pois é predominantemente excretada nas fezes. A tetraciclina é nefrotóxica e não deve ser usada em animais azotêmicos (VICENTE; PÉREZ-TRALLERO, 2010). A

recomendação para impedir o estado de portador em cães é um curso de duas semanas de doxiciclina, outros antibióticos como eritromicina e aminoglicosídeo são eficazes, mas os aminoglicosídeos não devem ser usados enquanto a função renal estiver comprometida. Cefalosporinas, cloranfenicóis e sulfonamidas são ineficazes (LANGSTON; HEUTER, 2003).

### 3.8.2. Tratamento de suporte

A terapia de suporte para os animais com leptospirose vai depender da gravidade da infecção, da presença ou não da disfunção renal ou hepática e de outros fatores complicantes (GREENE, 2006). A fluidoterapia é uma das primeiras considerações para o tratamento da insuficiência renal aguda causada pela leptospirose. Em animais que apresentam oligúria é indicado o uso de diurese química com agentes osmóticos como a manitol a 10% em 5mL/kg ou o uso de diuréticos tubulares como a furosemida, sendo a hemodiálise outra alternativa para o aumento da probabilidade de sobrevivência nesses casos (NELSON; COUTO, 2006).

O uso de antieméticos e protetores gástricos por via intravenosa pode ser necessário para tratar a gastrite urêmica. Os protetores gástricos são a base de histamina (bloqueadores dos receptores H<sub>2</sub>) e incluem famotidina (0,5 a 1 mg / kg por via intravenosa a cada 24 horas), ranitidina (2,2 mg / kg por via intravenosa a cada 24 horas) ou cimetidina (2,5–5 mg / kg IV a cada 12 horas). O sucralfato (0,25 a 1 g por via oral a cada 6 a 8 horas) auxilia na cicatrização de úlceras urêmicas (LANGSTON; HEUTER, 2003).

Quando o pH do sangue persiste abaixo de 7,2 ou a concentração sérica de bicarbonato é menor que 16 mEq / L caracterizando uma acidose metabólica, o uso de bicarbonato de sódio é recomendado. A transfusão sanguínea ou de plasma pode ser necessária e deve ser feita com cautela em casos com hemorragias petequiais e equimóticas que indicam trombocitopenia por vasculite ou CID (GREENE et al., 2006).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. LOCAL DE ESTUDO

A pesquisa foi realizada com os cães atendidos na rotina do HUMV- UFRB. O HUMV da UFRB foi estabelecido pela Portaria 319/2014, e inaugurado em 4 de abril de 2014. É o principal centro de referência em serviços médicos-veterinários na cidade de Cruz das Almas e região. Presta serviços na área de Medicina Veterinária à comunidade local, regional e nacional. E desenvolve atividades de apoio ao curso de Medicina Veterinária no âmbito do ensino, pesquisa e extensão.

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), protocolo nº 23007.00002178/2019-47, seguindo os Princípios Éticos na Experimentação Animal.

### 4.2. AMOSTRAS

Foram coletadas amostras de sangue de 44 cães (*Canis familiaris*) atendidos na rotina do HUMV- UFRB durante o período de dois meses, independentemente o motivo da consulta, sexo ou idade. Só foram coletadas amostras dos cães cujos tutores concordaram em participar do estudo e que foram atendidos pelos médicos veterinários membros da equipe vigente do HUMV-UFRB registrados no projeto.

Antes de iniciar a coleta, um termo de consentimento e esclarecimento (ANEXO 1) foi fornecido ao proprietário com o intuito de informá-lo sobre o estudo e procedimentos que seriam realizados, após autorização procedia-se a coleta das amostras.

O animal foi contido, com o uso de uma mordaca para impedir sua tentativa de defesa. O sangue foi obtido de cada animal por punção venosa da veia cefálica ou jugular, com o uso de seringas descartáveis de 3 mL e agulha estéril adequada ao porte do animal, depois de realizado antissepsia ( GARCIA-NAVARO, 2005) da área

com algodão embebido em álcool a 70%, não tendo sido necessário realizar tricotomia da região.

As amostras de sangue foram despejadas cuidadosamente em um tubo sem anticoagulante, identificadas e levadas sob refrigeração ao Laboratório de Doenças Infecciosas (LDI) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, onde passaram por centrifugação a 3000 rpm, por dez minutos, sendo o soro acondicionado em tubos tipo eppendorf a 20°C negativos até o momento do exame.

#### 4.3. INQUÉRITO EPIDEMIOLÓGICO E EXAMES COMPLEMENTARES

Os responsáveis pelos cães responderam um questionário epidemiológico, elaborado com o intuito de verificar a ausência ou presença de algumas práticas e condições que atuem como possíveis fatores de risco para a leptospirose canina. As primeiras questões tiveram por objetivo identificar o animal (raça, sexo, faixa etária) e estabelecer sua localização (cidade e bairro), posteriormente foi questionado sobre algumas condições como acesso à rua, contato com outros animais, presença de ratos no domicílio, hábito de mexer no lixo, local em que é ofertado água e comida e por último foi questionada a cerca do motivo da consulta ao veterinário naquela ocasião. A entrevista foi realizada face a face. Aplicou-se um questionário para cada cão do qual foi colhida a amostra de sangue, mesmo quando compartilhavam o mesmo tutor. Os dados foram tabulados e elaborados gráficos para um melhor entendimento.

Os parâmetros fisiológicos foram obtidos com o acesso as fichas de atendimento clínico do dia da consulta dos animais. Algumas fichas encontravam-se incompletas. Quanto aos exames complementares foram utilizados aqueles que, por algum motivo, foram solicitados pelo médico veterinário responsável pelo atendimento. Todos os animais têm resultados de hemograma, mas exames como bioquímica sérica ou exames de imagem foram pouco solicitados.

#### 4.4. ELISA indireto

O Elisa indireto utilizado foi padronizado no Laboratório de Doenças Infecciosas – UFRB e publicado por Fernandes et al., 2019 ; Souza et al., 2019. Para obtenção do antígeno um pool de 23 sorovares de *Leptospira spp* passou pelo processo de homogeneização e centrifugação que resultou na obtenção de três frações antigênicas: sobrenadante 1, sobrenadante 2 e sedimento ( massa) . Nesse ensaio utilizou-se o sobrenadante inativado pelo calor a 60 °C. Na padronização do teste com esse antígeno a sensibilidade obtida foi de 95,12% e a especificidade 92,68 % (SOUZA et al., 2019).

Para realização do teste a primeira etapa foi à sensibilização da placa de ELISA. Em um tubo falcon foi adicionado 5 ml do tampão carbonato e 50µl do antígeno . Antes de crescer com os 50µl do antígeno (Ag), retirou-se a mesma quantidade do tampão fazendo uma diluição 1:100. Feito isso, foi colocado 50µl da diluição por poço na placa e levado à geladeira dentro da câmara úmida por 16 horas.

A segunda etapa constituiu-se do bloqueio da placa. Para tanto se utilizou PBS-T a 5 % e leite em pó mólico, nas quantidades de 10 ml e 0,5g respectivamente. Foi colocado 100µl da mistura por poço e levado à estufa ( 37 °C) por 2 horas, sempre dentro da câmara úmida. Após as 2 horas os poços foram lavados 5 vezes utilizando PBS-T. Para fazer o PBS-T, utilizou-se água destilada, NaCl, tampão fosfato e tween 20.

Dando sequência, realizou-se a diluição das 44 amostras de soro dos cães coletados e armazenados previamente. A diluição foi 1:100 com a utilização de 10 µl de soro para 1000 µl de mólico a 1%. Essa diluição foi distribuída nos poços, 50µl/poço, sendo colocado na estufa à 37 °C por 1 hora, dentro da câmara. Após a estufa, foi feita a mesma lavagem dos poços da etapa anterior.

Em seguida, colocou-se o conjugado (anti-imunoglobulina total de cão produzida em coelho), 50µl por poço durante 1 hora à estufa. Lavou-se a placa 5 vezes com PBS-T. Em seguida acrescentou-se 50 ul da solução reveladora (10ml de ácido cítrico mais 0,00014g de OPD mais 4µl de água oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)), essa solução necessita ser deixada em contato por 30 minutos ao fim dos quais a reação foi

freada utilizando ácido sulfúrico. Realizou-se a leitura da densidade ótica em espectrofotômetro com filtro de 492 nm.

#### 4.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As informações obtidas foram armazenadas em banco de dados da planilha do Microsoft Excel (versão 2010), na qual a distribuição de frequência foi calculada. Para análise foram utilizados o teste do Qui-quadrado ( $\alpha \leq 0,05$  – Exato de Fischer), mediante software estatístico instat 3.0.



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 44 amostras coletas, 19 deram positivas para leptospirose ao serem testadas por ELISA indireta tendo como antígeno o sobrenadante de um pool de 23 sorovares de *Leptospira spp.*, gerando uma prevalência de 43 %. Prevalência de 30% (AZEVEDO, 2015) e de 34% (MATOS, 2015) foram encontradas em levantamentos sorológicos para leptospirose realizados em anos anteriores no município de Cruz das Almas- Ba, local em que se localiza o HUMV-UFRB .

Nesse levantamento sorológico foi utilizado o teste ELISA indireto . O ensaio evita a necessidade de manutenção de culturas vivas e é passível de automação o que possibilita a realização de forma rápida e prática (ADLER; MOCTEZUMA, 2010). Por esse motivo, novos testes ELISA indireto vêm sendo elaborados e testados. O teste ELISA utilizado nesse trabalho ao ser testado por Souza et al. ( 2019) obteve excelente desempenho com relação à sensibilidade (95,12% ) e especificidade (92,68%) conseguindo discriminar as amostras de animais tidos como infectados das de animais não infectados.

Como o ELISA detecta anticorpos IgM produzidos em resposta a LipL 32, um antígeno específico do gênero e amplamente reativo , não é um teste adequado para a identificação do sorovar ou sorogrupo causador (MUSSO; LA SCOLA, 2013). Essa limitação em identificar o sorovar infectante é comum a outros testes diagnósticos; apesar de a identificação do sorovar ter valor significativo epidemiológico e de saúde pública, não é relevante para o manejo individual do paciente (LEVETT, 2001). E assim dependendo do intuito, como por exemplo, para tratamento rápido de animais infectados, é suficiente a realização do ELISA indireto.

Em relação aos resultados da associação entre as variáveis epidemiológicas e a detecção de anticorpos anti-leptospira, o parâmetro que revelou significância quando contrastada com a soropositividade para leptospirose foi o sexo, sendo que as outras variáveis não apresentaram diferença significativa (Tabela 1). A porcentagem dentre cães machos foi significativamente maior, corroborando os mesmos resultados verificados por outros autores (MODOLO et al. 2006; AGUIAR et al.,

2007; KIKUTI et al., 2012). Uma explicação para esse resultado é o comportamento sexual do macho, lambendo e cheirando a genitália da fêmea, e pelo hábito de marcação territorial, cheirando a urina de outros animais (MODOLO et al., 2006). Esses comportamentos os tornam mais susceptíveis por a urina ser um dos principais meios de eliminação da bactéria (FAINE et al., 2000).

**Tabela 1-** Significância ( $\alpha \leq 0,05$ ) da associação das variáveis epidemiológicas e a detecção de anticorpos anti-leptospira ao teste ELISA indireto realizado nos cães atendidos no HUMV- UFRB no período de dois meses.

Variáveis	Sorologia positiva	Sorologia negativa	Total	p-valor
<b>IDADE</b>				
2 meses a 5 anos	4 ( 9%)	13 ( 30%)	17 ( 39%)	0.0605
> de 5 anos	15 (34 %)	12 ( 27%)	27 (61%)	
<b>SEXO</b>				
Macho	12 (27%)	7 ( 16%)	19 ( 43%)	0.0316*
Fêmea	7 (16 %)	18 ( 41%)	25 (57%)	
<b>RAÇA</b>				
SRD	11( 25%)	12 ( 27%)	23 ( 52%)	0.5567
Raça definida	8 (18 %)	13 ( 30%)	21 (48%)	
<b>CONTACTANTES</b>				
Sim	15 (34%)	23 ( 52%)	38 ( 86%)	0.377
Não	4 (9 %)	2 ( 5%)	6 (14%)	
<b>ACESSO A RUA</b>				
Sim	7 ( 16%)	11( 25%)	18 ( 41%)	0.7600
Não	12 ( 27%)	14 ( 32%)	26 (59%)	
<b>PRESENÇA DE RATOS</b>				
Sim	10 ( 23%)	15 (34%)	18 ( 41%)	0.7609
Não	9 ( 20%)	10 ( 23%)	26 (59%)	
<b>FATORES AMBIENTAIS FAVORAVEIS</b>				
Sim	8 ( 18%)	9 (20%)	18 ( 41%)	0.7600
Não	11 ( 25%)	16 ( 36%)	26 (59%)	
<b>MEXE NO LIXO</b>				
Sim	6 ( 14%)	8 ( 18%)	14 ( 32%)	1

Não	13 ( 30%)	17 ( 39%)	30 (68%)	
<b>RECOLHE O RESTO DE COMIDA</b>				
Sim	6 ( 14%)	10 ( 23%)	16 ( 36%)	0.7530
Não	13 ( 30%)	15 (34%)	28 (64%)	
<b>TOTAL</b>	<b>19 (43%)</b>	<b>25 (57%)</b>	<b>44 (100%)</b>	

\*p ≤ 0,05. Fonte: elaboração da autora

No presente estudo, os animais com idade inferior ou superior a 5 anos mostraram-se igualmente reagentes, sem diferença significativa. A idade não representou um fator de risco apesar de este ter sido um dos parâmetros que chegou mais perto da significância (P- valor 0.06 ), com uma maior porcentagem para animais mais velhos. Outros autores verificaram maior frequência, com significância, em animais de maior idade (BATISTA et al., 2005; AGUIAR et al., 2007 ) , o que pode ser explicado pela maior oportunidade de exposição ao agente entre os animais mais velhos. No entanto Kikuti et al. (2012) apresentaram resultados que corroboram com a não relação estatística da idade com à infecção, assim como a raça que também não teve relação em nossa pesquisa.

Fatores ambientais como presença de lixo, esgotos a céu aberto e depósitos de materiais descartados, propiciam a presença de roedores (HAGIWARA, 2003), além disso, locais em que ocorrem enchentes ou alagamento garantem condições para a sobrevivência da *Leptospira* spp. no ambiente (GOMES, 2015). Assim resposta positiva a presença de um ou mais desses fatores foram agrupados em “fatores ambientais favoráveis”, que em nosso trabalho, estatisticamente não apresentou significância em relação à sorologia positiva destoando dos resultados de Batista et al. (2005) cujas análises mostram que enchentes é um fatores de risco para a leptospirose com p-valor de 0,039.

Com relação aos outros parâmetros analisados como fatores de risco, não se confirmou associação estatística com variáveis que normalmente estão relacionadas à ocorrência da doença, como o tipo de confinamento do animal e a presença de roedores (FREIRE; DE FREITAS , 2003; LOPES et al.,2005) . Essa ausência de associação pode ser justificada pelo fato de que as respostas obtidas dos proprietários não são totalmente confiáveis, uma vez que as pessoas podem

esquecer ou mesmo ocultar fatos que consideram indesejáveis (como presença de roedores em casa), o que torna muitas vezes inconclusivas as informações obtidas nos questionários.

Os dados clínicos e exames complementares coletados nos animais que fizeram parte da pesquisa foram simplificados e apresentados em tabela (Tabela 2). Parâmetros como temperatura, frequência cardíaca e respiratória foram classificados em diminuída, normal ou aumentada tendo como base valores fisiológicos descritos por Feitosa (2000).

**Tabela 2** - Parâmetros físicos e exames complementares dos animais submetidos ao teste ELISA indireto.

<b>Exame físico</b>	<b>Total</b>	<b>Sorologia positiva</b>	<b>Sorologia negativa</b>
<b>TEMPERATURA</b>			
<b>Hipotérmico</b>	2 cães	1 cão	1 cão
<b>Normotérmico</b>	25 cães	10 cães	15 cães
<b>Hipertérmico</b>	5 cães	1 cão	4 cães
<b>Não aferiu</b>	12 cães	7 cães	5 cães
<b>FC</b>			
<b>Bradycardia</b>	0	0	0
<b>FC fisiológica</b>	38 cães	16 cães	22 cães
<b>Taquicardia</b>	0	0	0
<b>Não aferiu</b>	6 cães	3 cães	3 cães
<b>FR</b>			
<b>Bradipneia</b>	2 cães	0	2 cães
<b>Eupneia</b>	23 cães	9 cães	14 cães
<b>Taquipneia</b>	10 cães	6 cães	4 cães
<b>Não aferiu</b>	9 cães	4 cães	5 cães
<b>LINFONODOS</b>			
<b>Reativos</b>	19 cães	10 cães	9 cães
<b>Não reativos</b>	25 cães	9 cães	16 cães
<b>HEMOGRAMA</b>			
<b>Com alteração</b>	34 cães	16 cães	18 cães

<b>Sem alteração</b>	10 cães	3 cães	7 cães
<b>BIOQUIMICO</b>			
<b>Com alteração</b>	9 cães	4 cães	5 cães
<b>Sem alteração</b>	0	0	0
<b>Não realizado</b>	35 cães	15 cães	20 cães

Fonte: elaboração da autora

A temperatura foi aferida em 72,7 % dos cães participantes da pesquisa, que apresentaram em sua maioria ( 78,1 %) normotermia. A febre é um das síndromes que pode ocorrer em animais com leptospirose, não sendo patognomônico, um dos seus sintomas é a hipertermia decorrente da resposta imune do hospedeiro ao patógeno (FAINE et. al., 2000). Dos animais que tiveram a temperatura aferida 15,6 % apresentavam hipertermia, com a temperatura muito próxima do fisiológico, lembrando que os valores fisiológicos utilizados são válidos para animais mantidos em repouso e em temperatura ambiente moderada (FEITOSA, 2000), e que os cães estavam sendo manipulados podendo ainda ter havido interferência da temperatura ambiente ao serem transportados. Mesmo que a hipertermia não tenha sido causada por essas alterações, apenas 20% (um cão) dos animais com hipertermia apresentaram sorologia positiva.

Todos os cães que tiveram a frequência cardíaca registrada (81,8 %) encontravam-se com os valores dentro do padrão fisiológico. A frequência respiratória registrada apresentou variações ao fisiológico tanto com bradipneia (5,7 %), como com taquipneia (28,6%). Os registros de taquicardia muitas das vezes vieram acompanhados da observação “animal ofegante”, o que pode ser causado por medo do animal em se encontrar sendo manipulado por pessoas e em local diferente do seu habitual.

O hemograma foi realizado em todos os animais da pesquisa. 84, 2 % dos cães com sorologia positiva apresentaram alteração no hemograma. A principal alteração encontrada foi anemia normocítica, normocrômica com presença de elementos que revelam regeneração ou resposta medular, que são: reticulocitose, anisocitose e policromasia. A regeneração, portanto, pode ser recente uma vez que são necessários dois a três dias para uma resposta regenerativa tornar-se evidente no sangue (GONZÁLEZ; DA SILVA, 2008). Animais com leptospirose podem apresentar

anemia regenerativa, por provável perda de sangue ou hemólise, ou anemia arregenerativa, devido à doença renal ou hepática crônica (LANGSTON; HEUTER, 2003; LAPPIN, 2006).

No leucograma apenas um animal positivo apresentou alteração que foi leucopenia por neutropenia. Apesar de esta alteração ser descrita na literatura como possível achado na fase inicial da infecção (leptospiremia) devido a intenso recrutamento das células polimorfonucleares pelos tecidos (LANGSTON; HEUTER, 2003), ela também é facilmente explicada quando analisado o estado geral do animal em questão, cuja queixa principal para que fosse trazido ao atendimento clínico consistiu em lesões na pele com aspecto inflamatório, não sendo portanto a alteração no hemograma obrigatoriamente associada a soropositividade para leptospirose .

O bioquímico foi um exame complementar pouco solicitado tendo resultados apenas para 20,5 % dos cães da pesquisa. Dois dos cães com sorologia positiva tiveram resultados nesse exame que chamaram a atenção por serem sugestivos para problema em órgãos que geralmente são acometidos em cães com leptospirose. Esses dois animais ainda foram submetidos a exame de ultrassonografia abdominal e os laudos auxiliaram na confirmação de alterações nesses órgãos

O primeiro cão tinha como queixa principal episódios de vômitos, diarreia, hematuria e possível cistite. Apresentava anemia arregenerativa e no bioquímico foi observado redução da relação albumina:globulina com proteínas totais altas e albumina reduzida; como a albumina é produzida pelo fígado sugere-se alteração nesse órgão (LASSEN, 2004; LOPES; BIONDO; SANTOS, 2007) . O nível de ureia no sangue apresentava valor elevado, mas o de creatinina não apresentava alteração ; a ureia é um mecanismo de excreção da amônia, que por sua vez tem na proteína sua principal fonte, um discreto aumento nos níveis de ureia não significa insuficiência renal principalmente se não vem acompanhado com alterações nos valores da creatinina que por sofrer menos influência de fatores exógenos é considerada um indicador mais confiável da taxa de filtração do glomérulo renal (BUSH et al., 1994). No entanto, na ultrassonografia os rins deste cão encontravam-se com espessamento da cortical e presença de sinal medular tendo como possíveis causas a senilidade ou doença renal crônica.

O segundo cão tinha como queixa principal a perda de apetite com consequente perda de peso. O animal apresentava anemia arregenerativa e valores quatro vezes maiores do que o fisiológico de creatinina e valores de ureia três vezes maiores. No laudo ultrassonográfico os cálices renais apresentando hiperecogenicidade e os rins cortical afilada e que é indicativo de lesão e atrofia renal irreversíveis estando associada a um pior prognóstico (YAMASHITA, 2015). Forrest et al (1998) ao avaliando as alterações renais em ultrassonografia de cães com leptospirose confirmada, encontraram aumento de volume renal, aumento da ecogenicidade do córtex renal, acúmulo de líquido na região perirrenal, pielectasia discreta e faixas de ecogenicidade aumentada na região medular dos rins, sendo essa última descrita pelos autores como um achado específico para essa doença, não tendo sido relatado nada similar nesse caso, não sendo confirmado que o problema renal está ligado a sorologia positiva uma vez que o animal é senil ( 10 anos) e não teve acompanhamento veterinário durante a vida .

A soropositividade, sozinha, não confirma a doença e sim a exposição ao patógeno que gera uma resposta imune por parte do hospedeiro. Um diagnóstico inicial da leptospirose é realizado com base nos sinais clínicos, avaliação do histórico e contexto epidemiológico (QUINN et al., 2005), após a suspeita a confirmação pode ser feita com a solicitação de exames laboratoriais (ETTINGER; FELDMAN, 2004). Os animais submetidos a esse estudo, em nenhum momento, apresentaram como suspeita ou diagnóstico diferencial a doença leptospirose. Mesmo após os resultados do ELISA indireto , os animais não foram submetidos a tratamento específico.

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos com esse trabalho demonstram que os cães da região do Recôncavo estão expostos ao patógeno *Leptospira* spp. não necessariamente estando doentes.

A confirmação da infecção com base em sinais clínicos e exames complementares é dificultada pelo polimorfismo clínico da leptospirose em cães e por as alterações, se presente, serem comuns a outra afecções.

A epidemiologia também não se mostrou útil, uma vez que nem sempre as mesmas variáveis são significantes.

A não confirmação clínica- epidemiológica faz com que se hesite em utilizar um tratamento a base de altas doses de antibióticos ao obter soropositividade utilizando testes diagnóstico não estabelecidos, mesmo quando possuem alta sensibilidade e especificidade .



## REFERÊNCIAS

- ACHA, P.N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**, 2.ed. Washington: Organizacion Panamericana de la Salud,. p.112-120, 425-449, 1986.
- ADLER, B.; MOCTEZUMA, A.P. Leptospira and Leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.140, n.3/4, p.287-296, 2010.
- AGUIAR, D.M. et al. 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** , v. 59, n. 1, p. 70-76, 2007.
- ALEXANDER, A.D. et al. Preservation of leptospires by liquid-nitrogen refrigeration. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 22, n. 3, p. 165-169, 1972.
- ALVES, C.J. et al. Avaliação dos níveis de aglutininas anti-leptospira em cães no município de Patos-PB, Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.7, n. 2, p. 17-21, 2000.
- ANZAI, E.K. Utilização da PCR para o Diagnóstico da Leptospirose em Cães naturalmente infectados por *Leptospira spp.* Londrina: UEL, 2006. 48 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.
- ATHANAZIO, D.A. et al. Rattus norvegicus as a model for persistent renal colonization by pathogenic Leptospira interrogans. **Acta tropica**, v. 105, n. 2, p. 176-180, 2008.
- BATISTA, C.S.A. et al. Seroprevalence of leptospirosis in stray dogs from Patos City, State of Paraíba, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 2, p. 131-136, 2004.
- BATISTA, C.S.A. et al. Soroprevalência e fatores de risco para a leptospirose em cães de Campina Grande, Paraíba. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia**, v. 57, n. 2, p. 179-85, 2005.
- 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. et al. ,Leptospirose em cães errantes encontrados em campus universitário: avaliação sorológica e exame direto da urina. **Seminário: Ciências Agrárias**, v.31, n. 1, p. 191-196, 2010.
- BHARTI, A.R. et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet infectious diseases**, v. 3, n. 12, p. 757-771, 2003.
- BIESDORF, S.M. et al. Sorologia negativa e PCR positiva: a importância da biologia molecular para o diagnóstico de leptospirose aguda em um cão. **Revista Clínica Veterinária**. v. 13, n. 73, p. 44-48, 2008

BRASIL. Manual de Leptospirose. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos. Programa Nacional de Leptospirose. 2ª ed. rev. **Brasília: Fundação Nacional de Saúde**. 98 p. 1995.

BULACH D.M. et al. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 39, p. 14560-14565, 2006.

BURR, P.; LUNN, K. ; YAM, P. Current perspectives on canine leptospirosis. **In Practice** , v. 31, p. 98-102, 2009.

BUSH, B.M. et al. **Interpretation of laboratory results for small animal clinicians**. Blackwell Scientific Publications Ltd, 1991.

CASTRO, J.R. et al. 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**, v. 44, n. 2, p. 217-222, 2010.

CÉSPEDES, M. Leptospirosis: enfermedad zoonótica emergente. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, v. 22, n. 4, p. 290-307, 2005.

CHOY, H.A. et al. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 5, p. 2441-2450, 2007.

CHOY, H.A. et al. The multifunctional LigB adhesion binds homeostatic proteins with potential roles in cutaneous infection by pathogenic *Leptospira interrogans*. **PLoS One**, v. 6, n. 2, p. e 16879, 2011.

COWGILL, L.D.; ELLIOTT, D. A. Insuficiência renal aguda. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária-doenças do cão e do gato**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanadara Koogan, v. 2, p. 1701-1721, 2004.

CRUVINEL, W.M .et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 2010.

CULLEN, Paul A. et al. Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* serovar Lai. **Infection and immunity**, v. 70, n. 5, p. 2311-2318, 2002.

D'ANDON, M.F.et al. *Leptospira Interrogans* induces fibrosis in the mouse kidney through Inos-dependent, TLR-and NLR-independent signaling pathways. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 1, p. e2664, 2014.

ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. Doenças Bacterianas In: **Tratado de Medicina Interna Veterinária: Doenças do cão e do gato**. Guanaba Koogan: Rio de Janeiro, 5.ed, p.418-419, 2004.

EVANGELISTA, K.V.; COBURN, J.. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. **Future microbiology**, v. 5, n. 9, p. 1413-1425, 2010.

- FAINE S. et al. **Leptospira and leptospirosis**. MedScience; Melbourne, Australia: 1999.
- FAINE, S. et al. **Leptospira and Leptospirosis**. p. 272. Austrália: Medsci, 2000.
- FEITOSA, Francisco Leydson F. **Semiologia Veterinária: A Arte Do Diagnóstico**. Grupo Gen-Editora Roca Ltda., 2000.
- FERRAZ, E.G. et al. Receptores Toll-Like: ativação e regulação da resposta imune. RGO. **Revista Gaúcha de Odontologia (Online)**, v. 59, n. 3, p. 483-490, 2011.
- FORREST, L.J. et al. Sonographic renal findings in 20 dogs with leptospirosis. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 39, n. 4, p. 337-340, 1998.
- FRAGA, T.R.; BARBOSA, A.S.; ISAAC, L. Leptospirosis: aspects of innate immunity, immunopathogenesis and immune evasion from the complement system. **Scandinavian journal of immunology**, v. 73, n. 5, p. 408-419, 2011.
- FREIRE, R.L.; DE FREITAS, J.C. Fatores de risco associados à leptospirose em cães do município de Londrina-PR. **Semana: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 24, n. 1, p. 27-34, 2003.
- GONZÁLEZ, F.H. D.; DA SILVA, Sérgio Ceroni (Ed.). **Patologia clínica veterinária: texto introdutório**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.
- GREENE, C.E. et al. Leptospirosis. In: GREENE, C. E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. Georgia: Saunders, p. 402-417, 2006.
- GREINER, M.; GARDNER, I.A. Epidemiologic issues in the validation of veterinary diagnostic tests. **Preventive veterinary medicine**, v. 45, n. 1-2, p. 3-22, 2000.
- HAAKE, D.A. et al. Molecular evolution and mosaicism of leptospiral outer membrane proteins involves horizontal DNA transfer. **Journal of bacteriology**, v. 186, n. 9, p. 2818-2828, 2004.
- HAGIWARA, M.K. et al. Leptospirose canina. Boletim técnico: Saúde Animal, 2003.
- HARTSKEERL, R.A. et al. Classification of leptospira from the eyes of horses suffering from recurrent uveitis. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 51, n. 3, p. 110-115, 2004.
- JESUS, N.H. Meios Diagnósticos da Leptospirose Canina. Mossoró, UFERSA, 2009. 21 p. Monografia - Curso de Especialização em Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2009.
- JIMENEZ-COELLO, M. et al. Serological survey of canine leptospirosis in the tropics of Yucatan Mexico using two different tests. **Acta Tropica**, v. 106, n. 1, p. 22-26, 2008.
- JOUGLARD, S.D.D.; BROD, C. S. Leptospirose em cães: prevalência e fatores de risco no meio rural do município de Pelotas, RS. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 67, n. 2, p. 181-185, 2000.
- KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical chemistry of domestic animals**. London: Academic Press, p. 885-906, 1997.

KIKUTI, M. et al. Occurrence and risk factors associated with canine leptospirosis. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 18, n. 1, p. 124-127, 2012.

KO, A.I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, p. 736– 747, 2009.

KOHN, B. et al. Pulmonary abnormalities in dogs with leptospirosis. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 24, n. 6, p. 1277-1282, 2010.

LANGSTON, C.E.; HEUTER, K. J. Leptospirosis. A re-emerging zoonotic disease. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, v. 33, n. 4, p. 791-807, 2003.

LAPPIN, M.R.. Doenças Bacterianas Polissistêmicas. In: COUTO, C. G.; NELSON, R. W. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 1222-1224, 2006.

LASSEN, E.D. Laboratory evaluation of the liver. In: THRALL, M. A. **Veterinary hematology and clinical chemistry**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. cap. 23, p. 355- 377, 2004.

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

LOPES, A.L.S. et al. Frequência sorológica antileptospírica em cães: sua correlação com roedores e fatores ambientais, em área territorial urbana. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 3, p. 289-296, 2005.

LOPES, S.T.A.; BIONDO, A. W.; SANTOS, A.P. **Manual de patologia clínica veterinária**. 3. ed. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2007.

MAGALHÃES, D.F et al. Prevalência de aglutininas anti-Leptospira interrogans em cães de Belo Horizonte, Minas Gerais, 2001 a 2002. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n 2, p. 167-174, 2006.

MALMSTROM, J. et al. Proteome-wide cellular protein concentrations of the human pathogen Leptospira interrogans. **Nature**, v. 460, n. 7256, p. 762, 2009.

MATSUNAGA, J., et al. Pathogenic Leptospira species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. **Molecular microbiology**, v. 49, n. 4, p. 929-946, 2003.

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.

MILLER, M.D. et al. Variability in results of the microscopic agglutination test in dogs with clinical leptospirosis and dogs vaccinated against leptospirosis. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 25, n. 3, p. 426-432, 2011.

MILLER, R.I. et al. Clinical and epidemiological features of canine leptospirosis in North Queensland. **Australian veterinary journal**, v. 85, n. 1-2, p. 13-19, 2007.

- MODOLO, José Rafael et al. Investigação soroepidemiológica de leptospirose canina na área territorial urbana de Botucatu, São Paulo, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, p. 598-604, 2006.
- MUSSO, D.; LA SCOLA, B.. Laboratory diagnosis of leptospirosis: a challenge. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 46, n. 4, p. 245-252, 2013.
- NAVARRO, C.E.; KOCIBA, G.J. Hemostatic changes in dogs with experimental *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae infection. **American journal of veterinary research**, v. 43, n. 5, p. 904, 1982.
- NELSON, R.W.; COUTO, C. G. Doenças bacterianas polissistêmicas. In: NELSON, R.W.; COUTO, C. G (Ed.) **Medicina interna de pequenos animais**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan p. 1221-1226, 2006,
- PALANIAPPAN, R.U.M. ; RAMANUJAM, S. ; CHANG, Y.. Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. **Current opinion in infectious diseases**, v. 20, n. 3, p. 284-292, 2007.
- PICARDEAU, M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. **Médecine et Maladies Infectieuses.**, v. 43, n. 1, p. 1-9, 2013.
- PICARDEAU, M. et al. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. **PloS one**, v. 3, n. 2, p. e1607, 2008.
- QUE-GEWIRTH, N.L.S. et al. A methylated phosphate group and four amide-linked acyl chains in *Leptospira interrogans* lipid A The membrane anchor of an unusual lipopolysaccharide that activates TLR2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 24, p. 25420-25429, 2004.
- QUINN, P.J.; et. al., **Veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 512p. 2005.
- RIBOTTA, M.J. et al. Development of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of leptospiral antibodies in dogs. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 64, n. 1, p. 32, 2000.
- RIVERA, J. et al. Fibrinogen-binding proteins of gram-positive bacteria. **Thromb Haemost**, v. 98, n. 3, p. 503-511, 2007.
- SANTIN, K. et. al. Pesquisa de aglutininas anti- *Leptospira* em cães clinicamente saudáveis e em cães com suspeita clínica de leptospirose. **Clínica Veterinária.**, n. 60, p. 48-52, 2006.
- SCHMITT, C.I.; JORGENS, E.N. Leptospirose em cães: uma revisão bibliográfica. **XVI Seminário interinstitucional de ensino, pesquisa e extensão**, p. 04-06, 2011.
- SCHULLER S. et . al . European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats. **Journal of Small Animal Practice**,v. 56,p. 159-79. 2015.
- SYKES, J.E. et al. 2010 ACVIM small animal consensus statement on leptospirosis: diagnosis, epidemiology, treatment, and prevention. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 25, n. 1, p. 1-13, 2011.

VICENTE, D.; PÉREZ-TRALLERO, E. Tetraciclina, sulfamidas y metronidazol. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica**, v. 28, n. 2, p. 122-130, 2010.

VIEIRA, M.L. et al. In vitro identification of novel plasminogen-binding receptors of the pathogen *Leptospira interrogans*. **PloS one**, v. 5, n. 6, p. e11259, 2010.

YAMASHITA, S.R. et al. O valor da espessura cortical renal em prever a função renal em pacientes renais crônicos. **Radiologia Brasileira**, v. 48, n. 1, p. 12-16, 2015.

**ANEXO 1**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA

**LEPTOSPIROSE****TERMO DE ESCLARECIMENTO E CONSENTIMENTO****TERMO DE ESCLARECIMENTO:**

O senhor (a) está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa “**Prevalência da Leptospirose Canina** nos cães atendidos pelo Hospital Universitário de Medicina Veterinária- UFRB”, sob responsabilidade do professor Robson Bahia, do curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB. O objetivo do presente trabalho é verificar a prevalência de animais acometidos pela Leptospirose na cidade de Cruz das Almas, Bahia. Sua participação é de caráter voluntário não obrigatório, e contribuirá de forma significativa no registro dos casos da doença em questão e na adoção de medidas de controle e prevenção na área da saúde humana e animal. É garantida a confidencialidade das informações geradas e a sua privacidade sobre as respostas da pesquisa.

**TERMO DE CONSENTIMENTO:**

Ciente do projeto que foi anteriormente exposto, eu \_\_\_\_\_, estou de acordo em participar desta pesquisa, autorizando assim o uso do resultado da mesma para publicações científicas a respeito do tema, assinando este consentimento em duas vias, ficando com a posse de uma delas.

Cruz das Almas \_\_\_\_\_, de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_

---

Assinatura

**ANEXO 2**

## Inquérito epidemiológico

Nome do tutor: \_\_\_\_\_

Contato: \_\_\_\_\_

RG do animal: \_\_\_\_\_

1. Endereço:

Cidade: \_\_\_\_\_

Bairro: \_\_\_\_\_

2. Sexo: ( ) Macho ( ) fêmea

3. Raça: \_\_\_\_\_

4. Idade: \_\_\_\_\_

5. Contactantes: ( ) sim ( ) não

Se sim, quais espécies: \_\_\_\_\_

6. Acesso à rua: ( ) sim ( ) não

7. Presença de roedores: ( ) sim ( ) não

8. Presença na rua de:

 Entulho. casa abandonada. água empossada. área com vegetação esgoto da casa ligado à rede.

9. O animal tem costume de mexer no lixo?

 SIM  NÃO

10. Sobre o pote de ração e água:

 Local: ( ) dentro da casa ( ) fora ( quintal ou aria) ( ) alimentação á vontade ( ) obedece horários. São recolhidos à noite? ( ) sim ( ) não

Motivo da consulta: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_