

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

U LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



LEPTOSPIROSE CANINA: ESTUDO RETROSPETIVO SOBRE A RELAÇÃO ENTRE AS
ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS, ACHADOS ECOGRÁFICOS E DESFECHO CLÍNICO

ADRIANA MARIA AMURETE ROQUE DOS SANTOS

ORIENTADOR:
Dr. Ricardo Miguel Pedroso Medeiros

COORIENTADORA:
Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus

2021

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

U LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



LEPTOSPIROSE CANINA: ESTUDO RETROSPETIVO SOBRE A RELAÇÃO ENTRE AS
ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS, ACHADOS ECOGRÁFICOS E DESFECHO CLÍNICO

ADRIANA MARIA AMURETE ROQUE DOS SANTOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutora Maria Manuela Castilho Monteiro de
Oliveira

VOGAIS:

Doutora Solange Judite Roque Coelho Alves
Gil Neves

Dr. Ricardo Miguel Pedroso Medeiros

ORIENTADOR:

Dr. Ricardo Miguel Pedroso Medeiros

COORIENTADORA:

Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus

2021

DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Nome: Adriana Maria Amurete Roque dos Santos

Título da Tese ou Dissertação: Leptospirose canina: estudo retrospectivo sobre a relação entre as alterações hematólogicas, achados ecográficos e desfecho clínico

Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas públicas): 2021

Designação do curso de
Mestrado ou de Doutora-
mento: Mestrado integrado em Medicina Veterinária

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

- Clínica Produção Animal e Segurança Alimentar
 Morfologia e Função Sanidade Animal

Declaro sobre compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

- Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
- Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de 6 meses, 12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial*;

* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três):

1. É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 12 de março de 2021

Assinatura: _____

Aos meus avós.

Agradecimentos

Ao chegar ao final deste documento, que representa a maior prova de resiliência que alguma vez passei, resta-me agradecer a quem permitiu a sua conclusão e a quem, das mais variadas formas, tornou este processo mais suportável.

Ao meu orientador, Dr. Ricardo Medeiros, o meu enorme agradecimento por acreditar em mim e no meu trabalho mesmo quando tudo parecia correr na direção errada. Tenho a agradecer toda a disponibilidade e atenção mesmo quando a vida tinha uma menor serenidade e o tempo era escasso. Mais importante ainda é agradecer toda a orientação no período de estágio e por me ter transmitido duas das características mais importantes de um Médico Veterinário: o espírito crítico e a vontade infinita de saber mais.

À minha co-orientadora, professora Luísa Mateus, obrigada por ter aceitado guiar-me com a mesma disponibilidade desde o primeiro momento em que entrei no seu gabinete até ao momento em que tudo muda e defendo um trabalho que se afasta da sua maior área de interesse. Durante este período, maior do que esperado e com mais entraves do que alguma vez podia prever, o seu apoio e dedicação foram fundamentais para a conclusão desta etapa do meu percurso profissional.

Não há palavras que descrevam o quanto me sinto agradecida por ter estagiado no Hospital Veterinário do Atlântico, um lugar que foi a minha segunda casa durante muito tempo e onde fiz verdadeiros amigos. Aos médicos – Dra. Ana Raposo, Dra. Carla Albano, Dra. Carolina Melo, Dra. Inês Sousa, Dra. Margarida Monteiro, Dr. Rúben Silva, Dr. Rui Lemos Ferreira, Dr. Rui Máximo, Dra. Sofia Domingues e todos aqueles com quem tive oportunidade de me cruzar e aprender – o meu mais sincero e enorme agradecimento. Obrigada por me transmitirem o máximo de conhecimento possível, por aguçarem a minha curiosidade e espírito crítico e por todos os valores que me incutiram enquanto pessoa e profissional. Às enfermeiras e auxiliares – Ana Reboredo, Joana Castro, Manu, Sara Bastos e Vanessa Coelho – Vocês são a força dos bastidores que permite que o espetáculo da Medicina aconteça! Estou eternamente grata por tudo o que me ensinaram. Às rececionistas – Ana Dias e Joana Narciso – que não foram menos importantes no meu percurso e que tinham sempre uma palavra reconfortante nos momentos mais difíceis. Aos meus colegas de estágio – Carla e Mário – obrigada por tornarem tudo mais divertido. Não podia ter pedido melhores companheiros para esta aventura! Um agradecimento especial à Dra. Sónia Miranda que, sem qualquer tipo de obrigação, me acolheu e guiou quando estava mais perdida e por ser um exemplo de dedicação e trabalho. Ainda não acredito que o seu dia tem 24 horas! Um obrigada ainda mais especial à pessoa que investiu cada segundo do seu tempo na minha formação e que se tornou um exemplo daquilo que aspiro ser no futuro. Dra. Rita Antunes, o meu mais sincero obrigada

por me fazeres acreditar nas minhas capacidades e por, durante esse processo, te teres tornado uma amiga para a vida!

Aos meus amigos e colegas de curso que tornaram todo este caminho mais leve e com os quais construí e continuo a construir algumas das minhas melhores memórias. À Carla, que além de me proporcionar momentos hilariantes, é ainda um exemplo de tenacidade. Tenho o maior orgulho em ti. À Maria Inês, que me mostrou que great minds think alike! Ao Saramago, aquele amigo com quem tudo continua igual mesmo após longos períodos de ausência, obrigada por enriqueceres a minha vida com humor e por me teres poupado anos de vida em transportes com todas as boleias que me deste! À Jessica, que me ensina todos os dias que vale a pena arriscar e fá-lo com a gargalhada mais épica da História. À Patrícia, com quem tenho das conversas mais cómicas, mas que está sempre lá quando o assunto é sério.

Às minhas amigas de sempre, Ana, Denise e Maria, um enorme obrigada por continuarem presentes mesmo quando o curso determinava a minha ausência e por me distraírem sempre de todos estes percalços. Maria, espero um dia poder compensar todos os índices que me fizeste!

À Lena que acompanhou este percurso tão de perto quanto a minha família.

Os agradecimentos mais importantes vão para a minha família, que constituem a minha base e me permitem evoluir sempre com uma rede de segurança. Aos meus pais que me motivaram do primeiro ao último segundo deste percurso. Obrigada pelo apoio incondicional e por acreditarem em mim em todos os momentos! À minha irmã que viveu tudo isto tão intensamente quanto eu. Obrigada por toda a paciência e por essa motivação inesgotável que surgia sempre que a minha batia no fundo. E ao Tiago que, sendo quase um irmão, merece um agradecimento sincero por todo apoio que me dá, seja com palavras ou com gelados! Gosto muito de vocês!

Agradeço ainda àqueles que, com os focinhos apoiados no computador, foram a melhor companhia que podia pedir ao longo deste trabalho!

Leptospirose canina: estudo retrospectivo sobre a relação entre as alterações hematológicas, achados ecográficos e desfecho clínico

Resumo

O estudo retrospectivo desenvolvido teve como objetivo caracterizar uma amostra de canídeos infectados com *Leptospira* spp., comparando os resultados obtidos com os descritos pela bibliografia disponível e, ainda, verificar se existem associações entre as alterações hematológicas, os achados ecográficos e o desfecho clínico dos casos.

A amostra do presente estudo é constituída por 17 cães diagnosticados com leptospirose no Hospital Veterinário do Atlântico durante um período de quatro anos.

As alterações analíticas mais frequentemente observadas na amostra incluem as concentrações elevadas de ureia (n=17), creatinina (n=17), FAS (n=14) e ALT (n=9), bem como a presença de leucocitose (n=11), neutrofilia (n=10) e trombocitopenia (n=10).

Todos os animais apresentaram alterações ao exame ecográfico, sendo as mais frequentes o aumento da ecogenecidade do córtex renal (n=10), renomegalia (n=8) e hepatomegalia (n=8).

Durante a hospitalização quase metade dos animais desenvolveram um quadro de infecção respiratória (n=8), verificando-se que a principal causa de morte dos animais deste estudo foi o desenvolvimento de hemorragia pulmonar (n=5).

É possível concluir que os resultados obtidos neste estudo apresentam uma elevada concordância com os resultados descritos por outros autores, porém não se verificou a existência de correlações entre as alterações analíticas, achados ecográficos e o desfecho clínico dos casos.

Palavras-chave: Leptospirose, ecografia, zoonose, cão, doença infecciosa

Canine Leptospirosis: a retrospective study on the relation between haematological alterations, ultrasonography findings and clinical outcome

Abstract

The aim of this study is to characterize, retrospectively, the data of dogs diagnosed with *Leptospira spp.* and compare the results with the current literature. Furthermore, to compare the haematological alterations, ultrasonography findings and clinical outcomes of the different cases.

The sample group consisted of 17 dogs diagnosed with leptospirosis at the Hospital Veterinário do Atlântico in the last four years.

High concentrations of urea (n=17), creatinine (n=17), ALP (n=14) and ALT (n=9) were the most common laboratorial findings in the sample group, as well as leucocytosis (n=11), neutrophilia (n=10) and thrombocytopenia (n=10).

Ultrasonography abnormalities were found in all the dogs, namely an increase in the echogenicity of the renal cortex (n=10), renomegaly (n=8) and hepatomegaly (n=8).

During hospitalization, nearly half of the sample group developed respiratory symptoms/infection (n=8), which lead to the main cause of death, pulmonary haemorrhage (n=5).

In conclusion, the results from this study are in concordance with results obtained from previous studies. On the other hand, no correlation was found between the haematological alterations, ultrasonography findings and clinical outcomes of the cases.

Keywords: Leptospirosis, ultrasound, zoonosis, dog, infectious disease

Índice

Agradecimentos	iv
Resumo.....	vi
Abstract.....	vii
Lista de tabelas	xi
Lista de gráficos	xi
Lista de abreviaturas	xii
Parte I - Relatório das atividades desenvolvidas no estágio curricular.....	1
1. Estágio curricular no Hospital Veterinário do Atlântico	1
Parte II – Revisão bibliográfica	3
1. Etiologia.....	3
2. Epidemiologia.....	4
2.1. Hospedeiros definitivos/reservatórios e hospedeiros acidentais	4
2.2. Transmissão e infecção	5
2.3. Fatores de Risco	6
2.4. Panorama na Europa	7
2.5. Panorama em Portugal.....	8
3. Patogenia.....	9
4.Imunidade.....	10
5. Diagnóstico.....	11
5.1. Anamnese e Sinais Clínicos	11
5.2. Hemograma	12
5.3. Análises bioquímicas.....	13
5.4. Urinálise	13
5.5. Diagnóstico imagiológico.....	13
5.5.1. Diagnóstico radiográfico	13
5.5.2. Diagnóstico ecográfico	14
5.5.3. Tomografia axial computadorizada (TAC)	15
5.6. Diagnóstico Sorológico.....	15

5.6.1. Teste de Aglutinação Microscópica (MAT).....	15
5.6.2. Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA).....	16
5.6.3. Testes rápidos.....	17
5.7. Diagnóstico por PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).....	18
5.8. Diagnóstico Bacteriológico.....	19
6. Tratamento.....	19
6.1. Antibioterapia.....	19
6.2. Tratamento de suporte.....	20
7. Monitorização.....	22
8. Prognóstico e Mortalidade.....	23
9. Profilaxia.....	23
10. Saúde Pública.....	24
Parte III - Leptospirose canina: estudo retrospectivo sobre a relação entre as alterações hematológicas, achados ecográficos e desfecho clínico.....	27
1. Objetivos do estudo.....	27
2. Materiais e Métodos.....	28
2.1. Amostragem.....	28
2.2. Critérios de Inclusão.....	28
2.3. Critérios de exclusão.....	28
2.4. Procedimentos.....	28
2.4.1. Consulta.....	28
2.4.2. Análises bioquímicas e hemograma.....	29
2.4.3. Técnica ecográfica.....	29
2.5. Recolha de dados e análise estatística.....	29
3. Resultados.....	30
3.1. Caracterização demográfica da amostra.....	30
3.2. Estilo de vida da amostra.....	31
3.3. Vacinação.....	31
3.4. Testes de diagnóstico.....	31

3.5. Estímulos iatrotópicos e anamnese.....	32
3.6. Exame físico.....	32
3.7. Análises bioquímicas.....	33
3.8. Hemograma	33
3.9. Relação entre existência de trombocitopenia e o desfecho do caso clínico.....	34
3.10. Urianálise	34
3.11. Alterações ecográficas	34
3.11.1. Ecografia renal	34
3.11.2. Ecografia hepática.....	35
3.11.3. Restante exame ecográfico	35
3.12. Relação entre a concentração de ureia e creatinina e alterações na ecografia renal	36
3.13. Relação entre a concentração de FAS e ALT e alterações na ecografia hepática	36
3.14. Relação entre a existência de alterações na ecografia renal e desfecho do caso clínico.....	37
3.15. Relação entre a existência de alterações na ecografia hepática e desfecho do caso clínico.....	38
3.16. Diálise.....	38
3.17. Radiografia torácica e hemorragia pulmonar.....	39
3.18. Desenvolvimento de quadro pulmonar e quadro anúrico/oligúrico durante a hospitalização	39
3.20. Relação entre o desenvolvimento de quadro anúrico/oligúrico e o desfecho do caso clínico.....	40
3.21. Alta médica e causa da morte	40
4. Discussão.....	40
5. Limitações.....	49
6. Conclusão.....	50
Parte IV - Referências bibliográficas.....	51

Lista de tabelas

Tabela 1 - Hospedeiros reservatório de serovares comuns (Adaptado de Schuller et al. 2015)	5
Tabela 2 - Recomendações de higiene e segurança em ambiente hospitalar (adaptado de Schuller et al. 2015).	26
Tabela 3 - Alterações detetadas no exame físico	32
Tabela 4 - Alterações detetadas nas análises bioquímicas	33
Tabela 5 - Alterações detetadas no hemograma	33
Tabela 6 - Relação entre a trombocitopenia e o desfecho clínico.....	34
Tabela 7 - Alterações detetadas na ecografia renal.....	35
Tabela 8 - Alterações detetadas na ecografia hepática	35
Tabela 9 - Alterações detetadas no restante exame ecográfico	36
Tabela 10 - Relação entre a concentração de FAS e a ecografia hepática.....	37
Tabela 11 - Relação entre a concentração de ALT e a ecografia hepática	37
Tabela 12 - Relação entre a ecografia renal e o desfecho clínico.....	38
Tabela 13 - Relação entre a ecografia hepática e desfecho clínico	38
Tabela 14 - Relação entre o desenvolvimento de quadro pulmonar e o desfecho clínico	39
Tabela 15 - Relação entre o desenvolvimento de quadro anúrica/oligúrico e o desfecho clínico	40

Lista de gráficos

Gráfico 1 - Distribuição da idade dos animais.....	31
--	----

Lista de abreviaturas

ADH - *Antidiuretic hormone* (hormona antidiurética)

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ALT - Alanina aminotransferase

AST - Aspartato aminotransferase

CID - Coagulação intravascular disseminada

Cl⁻ - Ião cloro

cTnI - Troponina cardíaca I

ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ensaio de imunoabsorção enzimática)

FAS – Fosfatase alcalina

IgG - Imunoglobulina G

IgM - Imunoglobulina M

IRIS - *International Renal Interest Society*

K⁺ - Ião potássio

LPS – Lipopolissacarídeo

MAT - *Microscopic agglutination test* (Teste de aglutinação microscópica)

MHC - *Major histocompatibility complex* (Complexo maior de histocompatibilidade)

Na⁺ - Ião sódio

OMPs – *Outer membrane proteins* (Proteínas da membrana externa)

PCR - *Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

TAC - Tomografia axial computadorizada

UPC - *Urine protein:creatinine ratio* (Rácio proteína:creatitina urinário)

WSAVA - *World Small Animal Veterinary Association*

Parte I - Relatório das atividades desenvolvidas no estágio curricular

1. Estágio curricular no Hospital Veterinário do Atlântico

O estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária (MIMV) foi realizado no Hospital Veterinário do Atlântico (HVA) em Maфра, sob a orientação do Dr. Ricardo Medeiros, durante um período de 6 meses, compreendido entre outubro de 2018 e março de 2019.

A equipa do HVA é constituída por Auxiliares, Enfermeiros e Médicos Veterinários com diferentes áreas de interesse no domínio dos animais de companhia (cão e gato).

O hospital dispõe de serviços de consultas de medicina preventiva, medicina interna, medicina reprodutiva, cardiologia, oncologia, dermatologia, odontologia, oftalmologia e ortopedia. O HVA dispõe ainda de um serviço de internamento, bem como uma unidade de isolamento destinada ao internamento de animais com doenças infecto-contagiosas. O HVA apresenta um bloco operatório devidamente equipado para a realização de cirurgias de tecidos moles e cirurgia ortopédica. Em termos de meios de diagnóstico, o HVA dispõe de serviços de radiografia, ecografia, eletrocardiografia e endoscopia, apresentando ainda um serviço de análises laboratoriais. Além disto, o HVA apresenta serviços de urgências 24 horas e deslocamentos ao domicílio.

O estágio curricular obedeceu a uma rotação semanal pelo serviço de consultas, de internamento, de cirurgia, de exames complementares de diagnóstico e análises laboratoriais e ainda à realização de turnos noturnos.

No serviço de consultas, as funções desempenhadas consistiam, numa primeira fase, em assistir a consultas das diversas áreas de atuação do HVA, discutindo com o Médico Veterinário os achados clínicos obtidos e a abordagem de cada caso. Numa segunda fase, os estagiários eram responsáveis pela realização da anamnese e realização de exame físico, partilhando os dados obtidos com o Médico Veterinário previamente à entrada do mesmo em consulta de forma a discutir eventuais diagnósticos diferenciais e planear uma estratégia de abordagem ao paciente.

No serviço de internamento os estagiários desempenham diversas funções como a alimentação dos animais e limpeza das suas boxes; passeio dos cães; monitorização dos animais internados através da realização de exames físicos; preparação e administração de medicação; realização de tratamentos como limpeza de feridas, lavagens vesicais, drenagens, colocação de cateteres, algaliação de gatos, entre outros. Os estagiários eram ainda incluídos na passagem de casos entre turnos, participando na discussão clínica dos casos internados e respetivos planos de diagnóstico e terapêutica instituída. O acompanhamento do Médico Veterinário responsável pelo internamento na realização de altas médicas e, ainda, a

realização das mesmas de forma autónoma para posterior discussão com o Médico Veterinário foram outras das funções desempenhadas no serviço de internamento.

A rotação pelo serviço de cirurgia previa a assistência e realização de consultas pré-cirúrgicas, a preparação dos animais para cirurgia (colocação de cateter venoso, tricotomia e preparação do campo cirúrgico), administração da medicação pré-anestésica, monitorização pós-cirúrgica dos animais e realização das altas de forma acompanhada ou autónoma. No bloco operatório algumas das tarefas consistiam na assepsia do campo cirúrgico, indução anestésica e intubação endotraqueal dos animais. Os papéis assumidos pelos estagiários no serviço de cirurgia incluíram o papel de anestesista, monitorizando a anestesia; o papel de ajudante de cirurgião em diversas intervenções como esterilização de cães e gatos de ambos os sexos, resolução de torção gástrica, esplenectomias, enterotomias e enterectomias, cistotomias, exérese de neofomações cutâneas, exérese de tumores abdominais, mastectomia, destarização e extração dentária e diversas cirurgias ortopédicas; e ainda o papel de cirurgião principal em ovariohisterectomias de cadela e gata, bem como castração de cão e gato. Além disto, tendo em conta a complexidade de alguns procedimentos cirúrgicos, o papel do estagiário passava pela observação da cirurgia sem intervenção, nomeadamente nos procedimentos de resolução de ducto arterioso persistente e lobectomia pulmonar.

A passagem pelo serviço de exames complementares de diagnóstico e análises laboratoriais tinha como objetivo auxiliar na realização dos diferentes exames e a discussão dos resultados obtidos. Em radiologia, as competências adquiridas passaram pelo posicionamento do paciente, escolha das constantes radiográficas e das projeções e, por último, a interpretação das imagens obtidas. O estagiário auxiliava na contenção dos animais durante a realização dos exames ecográficos, observando a sua realização e discutindo os achados do mesmo. Ainda neste serviço, o estagiário teve a oportunidade de praticar a técnica ecográfica. A observação de exames de endoscopia foi também uma das tarefas realizadas pelos estagiários neste serviço, incluindo esofagoscopia, gastroscopia, enteroscopia, colonoscopia, traqueoscopia e broncoscopia. O estagiário teve ainda a oportunidade de observar a remoção de corpos estranhos e a realização de biópsias através de endoscopia. Por sua vez, no laboratório, o estagiário pôde familiarizar-se com diferentes aparelhos, nomeadamente de hemograma, análises bioquímicas e provas de coagulação. Além disto, o estagiário realizou diversos testes rápidos de diagnóstico de doenças infecciosas e pôde observar e interpretar citologias. A competência mais importante adquirida neste serviço passou pela interpretação dos resultados obtidos e a sua discussão com a equipa do HVA.

Parte II – Revisão bibliográfica

1. Etiologia

A leptospirose é uma doença zoonótica de origem bacteriana provocada por espiroquetas do género *Leptospira*. As bactérias pertencentes a este género são filamentosas e helicoidais, apresentando uma largura entre 0,1 a 0,2µm e um comprimento entre 6 a 12µm (Greene et al. 2012). As *Leptospira* spp., que possuem as extremidades em forma de gancho, são ainda dotadas de motilidade translacional e não translacional devido à presença de dois flagelos periplasmáticos em posição subterminal (Fraga et al. 2015).

Tal como outras espiroquetas, as *Leptospira* spp. apresentam uma dupla membrana, apresentando simultaneamente características de bactérias Gram-positivas e negativas. A membrana citoplasmática das *Leptospira* spp. está em contacto com a parede celular rica em peptidoglicanos que, por sua vez, é revestida por uma membrana externa. A membrana externa é constituída sobretudo por fosfolípidos, proteínas membranares e lipopolissacarídeo (LPS) (Fraga et al. 2015). Apesar de ser um componente que contribui para a patogenicidade da *Leptospira* spp., o LPS encontrado neste género de bactérias difere do encontrado nas restantes bactérias Gram-negativas, apresentando uma composição única do Lípido A que conduz a uma menor toxicidade do mesmo (Que-Gewirth et al. 2004; Adler and Moctezuma 2010). Todavia, o LPS é considerado um fator de virulência da *Leptospira* spp., tendo sido demonstrado que a sua ausência impede a infeção dos animais e que a sua presença é determinante para o surgimento de insuficiência renal aguda (Nally et al. 2005; Fraga et al. 2015).

As diferentes espécies pertencentes ao género *Leptospira* podem ser classificadas como saprófitas, encontrando-se em vida livre em ambientes aquosos; ou como patogénicas quando apresentam a capacidade de infetar espécies animais, podendo desencadear leptospirose.

Para além da divisão previamente apresentada, as espécies do género *Leptospira* são ainda classificadas consoante a ocorrência de aglutinação antigénio-anticorpo quando em contacto com um soro específico, sendo o LPS bacteriano o principal componente antigénico que conduz à aglutinação (Fraga et al. 2015). Esta classificação atribui a denominação de serovar a um membro do género *Leptospira* que reaja com um soro monoclonal específico. Por sua vez, entende-se por serogrupo um conjunto de serovares cujos antigénios são comuns, desencadeado aglutinação quando expostos a soros contendo anticorpos contra serovares do mesmo grupo (Greene et al. 2012; Schuller et al. 2015). Atualmente estão identificados mais de 250 serovares, incluídos em mais de 25 serogrupos dos quais 10 são importantes para a espécie canina (Greene et al. 2012; Goarant 2016).

Uma vez que o diagnóstico serológico é o mais utilizado, a classificação com base no serovar é a mais empregue, todavia esta não se correlaciona com a taxonomia genética. Para

além disto, o mesmo serogrupo pode conter bactérias que pertençam a espécies diferentes de *Leptospira* spp., levando a equívocos. Embora tenham sido realizadas tentativas de associar a apresentação clínica da infecção com um determinado serovar ou serogrupo, estas foram infrutíferas visto que serovares pertencentes a um determinado serogrupo podem apresentar diferenças genéticas que determinem patogenicidades diferentes, bem como diferentes hospedeiros reservatórios (Greene et al. 2012; Levett 2015; Goarant 2016).

A classificação genética de *Leptospira* spp. baseia-se no grau de semelhança do ácido desoxirribonucleico (ADN), tendo sido identificadas 21 espécies diferentes (Ramadass et al. 1992; Levett 2015).

2. Epidemiologia

As bactérias do género *Leptospira* são ubiqüitárias, existindo em todo o mundo, exceto nas regiões polares. Estas bactérias podem afetar praticamente todos os mamíferos, embora diferentes espécies apresentem suscetibilidades diferentes à infecção.

Um dos fatores mais determinantes na epidemiologia da leptospirose prende-se com a excreção de bactérias para o ambiente por parte dos animais cronicamente infetados, contribuindo para a infecção de novos animais (Ellis 2015).

2.1. Hospedeiros definitivos/reservatórios e hospedeiros acidentais

De forma a compreender a epidemiologia da leptospirose é necessário definir a existência de hospedeiros definitivos e de hospedeiros acidentais para cada serovar existente. Entende-se por hospedeiro definitivo ou reservatório o animal que se encontra adaptado à infecção por um determinado serovar, desenvolvendo uma infecção persistente e assintomática (Goldstein 2010). As bactérias permanecem nos túbulos renais dos animais cronicamente infetados e são excretadas durante meses a anos após a infecção, contribuindo para a perpetuação da doença. Por sua vez, os restantes animais são considerados hospedeiros acidentais, desenvolvendo doença aguda ou subaguda quando em contacto com a urina dos hospedeiros definitivos. Os animais acidentalmente infetados excretam *Leptospira* spp. na urina durante um curto período de tempo e a transmissão da doença entre hospedeiros acidentais não é viável (Fraga et al. 2015).

É importante destacar que a mesma espécie animal pode ser considerada um hospedeiro definitivo para um determinado serovar e um hospedeiro acidental para outros. Por exemplo, o cão é considerado hospedeiro reservatório de *L. interrogans* serovar Canicola, sendo altamente suscetível a outros serovares. Existe um elevado número de associações entre serovares e hospedeiros reservatórios que são passíveis de se estabelecer devido a um processo de co-evolução que permite a adaptação dos dois intervenientes (Tabela 1) (Schuller et al. 2015; Goarant 2016).

É ainda importante realçar que, tal como demonstrado por Ganoza et al. (2010), os humanos podem agir como hospedeiro reservatório e excretar *Leptospira* spp. por via urinária, embora não existam dados sobre o seu papel na transmissão da doença.

Tabela 1 - Hospedeiros reservatório de serovares comuns (Adaptado de Schuller et al. 2015)

Hospedeiro reservatório	Serovar
Porco	Pomona, Tarassovi
Grandes Ruminantes	Hardjo, Pomona
Cavalo	Bratislava
Cão	Canicola
Pequenos Ruminantes	Hardjo
Ratazanas	Icterohaemorrhagiae, Copenhageni

2.2. Transmissão e infeção

A transmissão de *Leptospira* spp. pode dar-se de forma direta e indireta. A forma direta prende-se com o contacto direto entre as mucosas ou a pele que contenha cortes ou abrasões com a urina infetada de hospedeiros reservatório. Os animais podem ser também infetados por via oronasal quando em contacto com fluidos corporais ou sangue de animais em fase de bacteriémia (Greene et al. 2012; Fraga et al 2015). Além da transmissão placentária, o contacto venéreo é também uma fonte de infeção. Um estudo conduzido por Hamond et al. (2014) demonstrou a presença de ADN pertencente ao serovar Bratislava no fluido vaginal de éguas reprodutoras aparentemente saudáveis, presença esta que pode ser justificada pela penetração das bactérias através da mucosa. Estes resultados permitem concluir que a transmissão de *Leptospira* spp. de fêmeas para machos é possível através do contacto sexual. Por outro lado, segundo Levett (2001) a transmissão de *Leptospira* spp. entre humanos pode ocorrer através da amamentação. Esta via de transmissão torna-se especialmente preocupante quando direcionada aos roedores, cujas ninhadas são grandes e frequentes, uma vez que estes são os principais hospedeiros reservatório de *Leptospira* spp.. Um estudo realizado por De Oliveira et al. (2016) demonstrou a existência de bactérias do género *Leptospira* no leite e tecido mamário de ratazanas, concluindo que esta via de transmissão pode contribuir de forma exponencial para o aumento de hospedeiros reservatório.

A transmissão indireta dá-se pela exposição dos hospedeiros acidentais ao solo, comida ou fontes de água contaminados. Um dos ambientes mais favoráveis à sobrevivência destas bactérias no exterior é a presença de água estagnada onde as *Leptospira* spp. formam biofilmes em superfícies orgânicas e inorgânicas. No solo, um pH neutro ou ligeiramente alcalino mostra ser benéfico para a sobrevivência das mesmas. Aliás, as *Leptospira* spp. podem viver durante meses neste tipo de ambientes, vivendo apenas de forma transitória quando expostas a urina com pH ácido (5.0 a 5.5) (Greene et al. 2012).

As *Leptospira* spp. apresentam uma elevada sensibilidade a ambientes de congelação, desidratação ou à exposição a raios ultravioleta. Por outro lado, temperaturas entre os 0º e os 25ºC favorecem a manutenção destas bactérias no ambiente (Goldstein 2010; Greene et al. 2012).

Tendo em conta as condições ambientais favoráveis para o desenvolvimento da doença, é seguro afirmar que a mesma ocorre com mais frequência no fim do verão e durante o outono (Ward et al. 2002; Raghavan et al. 2012; Grayzel and DeBess 2016; López et al. 2019; Smith et al. 2019).

É importante destacar que a estas bactérias não se multiplicam no ambiente, por isso, os hospedeiros reservatório são essenciais para a contaminação contínua do mesmo e conseqüente infeção dos animais suscetíveis (Greene et al. 2012; Raghavan et al. 2012).

A eliminação de *Leptospira* spp. através da urina pode ocorrer durante períodos de tempo variáveis dependentes do serovar e das características intrínsecas do hospedeiro definitivo. Cães cronicamente infetados e assintomáticos podem eliminar estas bactérias durante dias a meses após a infeção inicial, como demonstrado em diversos estudos (Khorami et al. 2010; Samir et al. 2015; Harkin and Hays 2016; Sant'Anna et al. 2017; Sant'Anna et al. 2018; Zaidi et al. 2018; Miotto et al. 2018a). Desta forma, embora o papel da espécie canina na transmissão zoonótica da doença ainda não esteja esclarecido, é possível afirmar que estes animais contribuem para a disseminação de *Leptospira* spp. no ambiente (Miotto et al. 2018a).

Por outro lado, espécies que apresentam uma baixa suscetibilidade à infeção por *Leptospira* spp. como o gato podem ser fontes de contaminação ambiental, facilitando a transmissão indireta da doença (Chan et al. 2014; Rodriguez et al. 2014).

2.3. Fatores de Risco

O conhecimento dos fatores de risco associados ao desenvolvimento de leptospirose é imprescindível para o estabelecimento de estratégias de prevenção. Deste modo, vários estudos têm sido realizados ao longo do tempo com este objetivo, no entanto, os resultados obtidos pelos mesmos revelam uma enorme disparidade, provavelmente relacionada com o tamanho reduzido da população em estudo (Rentko et al. 1992; Birnbaum et al. 1998; Adin and Cowgill 2000). Um estudo realizado por Ward et al. (2002) teve como objetivo colmatar

as lacunas dos estudos anteriores. Desta forma, 677 cães diagnosticados com leptospirose foram analisados quanto aos fatores de risco. Os resultados obtidos revelaram que cães com idades compreendidas entre 4 e 9,9 anos apresentam um maior risco de contrair leptospirose, quando comparados com cães com idade inferior a um ano. Aliás, vários estudos têm demonstrado a existência de correlação entre a idade do animal e a obtenção de títulos positivos no teste de aglutinação microscópica (MAT), confirmando um menor risco de infecção em cães com idade inferior a um ano (Grayzele and DeBess 2016; Delaude et al. 2017; López et al. 2019). Por outro lado, Smith et al. (2019) concluíram que cães com menos de um ano apresentam um maior risco de leptospirose, enquanto Kikuti et al. (2012), por sua vez, não encontraram evidências de que a idade influenciasse o risco de infecção por *Leptospira* spp..

Outro potencial fator de risco na leptospirose baseia-se no sexo do animal, sendo que vários estudos demonstraram que os machos apresentam um maior risco de contrair esta infecção (Ward et al. 2002; Kikuti et al. 2012; López et al. 2019; Smith et al. 2019).

Através da realização de um questionário a tutores foi possível concluir que o desenvolvimento desta doença teve uma correlação positiva com o acesso a fontes de água, como lagos, e a caça de roedores (Cárdenas et al. 2018), semelhantemente ao referido num estudo realizado por Grayzel e DeBess (2016). O estudo realizado por Ward et al. (2002) revelou ainda que cães de pastoreio apresentavam um maior risco de infecção por *Leptospira* spp., independentemente do sexo e que cães de caça e trabalho exibiam um maior risco de leptospirose.

A transmissão indireta da doença é altamente motivada por fatores ambientais, nomeadamente níveis elevados de precipitação, cheias frequentes e más condições higiossanitárias (Raghanvan et al. 2012; Schuller et al. 2015; Smith et al. 2019).

Por outro lado, seria de esperar que cães em ambiente rural apresentassem maior risco de infecção por *Leptospira* spp.. No entanto, alguns estudos têm apontado as áreas urbanas e suburbanas como as de maior risco para a espécie canina. Pensa-se que este último fator se deva à sobrepopulação e à existência de áreas que a promovam como parques caninos ou canis e à má drenagem das águas pluviais devido a superfícies impermeáveis (Scanziani et al. 2002; Raghavan et al. 2011; Azócar-Aedo and Monti 2015; Schuller et al. 2015).

2.4. Panorama na Europa

A leptospirose canina tem sido associada aos serogrupos Canicola e Icterohaemorrhagiae, no entanto esta espécie pode ser infetada por diversos serogrupos. A introdução há mais de 50 anos de uma vacina bivalente específica para os serogrupos Canicola e Icterohaemorrhagiae na Europa e nos Estados Unidos da América conduziu à diminuição da prevalência de leptospirose provocada pelos mesmos. Uma vez que esta vacina não induz imunidade contra outros serogrupos, o aparecimento de leptospirose passou a ser associado

mais frequentemente ao serogrupo Grippotyphosa e ao serovar Bratislava pertencente ao serogrupo Australis. Para além dos serovares previamente mencionados, dados de seroconversão na Europa indicam ainda a elevada prevalência dos serogrupos Sejroe e Pomona (Geisen et al. 2007; Ellis 2010; Mayer-Scholl et al. 2013; Schuller et al. 2015; López et al. 2019). Tendo em conta as alterações de seroprevalência mencionadas, surgiu a necessidade de introduzir uma nova vacina no mercado direcionada para a *L. interrogans* serogrupo Canicola serovar Porland-vere, *L. interrogans* serogrupo Icterohaemorrhagiae serovar Copenhageni, *L. interrogans* serogrupo Australis serovar Bratislava e *L. kirschneri* serogrupo Grippotyphosa serovar Dadas (Arent et al. 2012; Schuller et al. 2015; Delaude et al. 2017; López et al. 2019). Com a introdução desta vacina é provável que volte a ocorrer uma alteração na seroprevalência dos diferentes serogrupos, no entanto a utilização da mesma ainda não é suficientemente ampla para constatar esta mudança (López et al. 2019).

Em relação à distribuição geográfica dos diferentes serogrupos, é possível afirmar que o serogrupo Icterohaemorrhagiae pode ser encontrado em toda a Europa devido ao facto do seu hospedeiro reservatório, o rato, ser ubiqüitário. Na Alemanha, o serogrupo Grippotyphosa é considerado o maior causador de leptospirose em cães, seguido pelo serogrupo Sejroe. O primeiro serogrupo já foi encontrado em diversos países nomeadamente na República Checa, Polónia, Croácia e Suíça (Ellis 2010; Delaude et al. 2017; Habus et al. 2017).

O serovar Bratislava é considerado o principal agente causador de Leptospirose nos cães em Itália, acompanhado do serogrupo Grippotyphosa (Scanziani et al. 2002).

2.5. Panorama em Portugal

Um estudo realizado por Collares-Pereira (1992) na região do Alto Douro identificou uma seroprevalência de 32,1% numa população de 701 cães pertencentes àquela região. Os serogrupos que mais frequentemente geraram seroconversão incluíram o serogrupo Canicola (66,2%) e Sejroe (20,0%).

Mais tarde, em 2011, um estudo realizado em Beja abrangendo apenas nove cães, identificou que o serovar Bratislava foi o principal agente desencadeador de leptospirose, originando doença em seis destes casos. O serogrupo Grippotyphosa foi identificado em dois destes animais enquanto o serogrupo Icterohaemorrhagiae apenas em um (Lança 2011).

Uma vez que o recurso ao MAT como meio de diagnóstico nem sempre se verifica, estudos mais recentes têm falhado no que diz respeito à identificação dos serovares infetantes em casos de leptospirose canina em Portugal.

3. Patogenia

As bactérias do género *Leptospira* infetam os animais através das mucosas ou através da pele contendo abrasões ou feridas. Os mecanismos moleculares que permitem a entrada das bactérias ainda são desconhecidos, no entanto, existem um conjunto de outros fatores que facilitam a mesma. A motilidade, por exemplo, parece apresentar um papel muito importante na fase primordial da infeção, permitindo que as bactérias penetrem na pele do animal e atravessem as várias camadas da mesma, bem como os diferentes tecidos. Além disto, as *Leptospira* spp. apresentam a maioria dos genes responsáveis pela quimiotaxia na sua constituição, ou seja, respondem a um elevado número de estímulos químicos (Murray 2015). Um desses estímulos é a hemoglobina. Como tal, estas bactérias são atraídas para animais que apresentem lesões sanguinolentas e cujas barreiras cutâneas tenham sido danificadas (Lambert et al. 2012). É fundamental que após a entrada das *Leptospira* spp. no organismo se dê a adesão das mesmas às células do hospedeiro (Murray 2015).

O período de incubação da doença é bastante variável de acordo com a dose infetante, a estirpe, a forma de exposição e a imunidade do hospedeiro, no entanto, em média tem a duração de sete dias. Tal como o período de incubação, a gravidade das lesões provocadas pela infeção depende de vários fatores como a imunidade do hospedeiro e virulência da bactéria (Greene et al. 2012).

Uma vez no sangue, as bactérias multiplicam-se rapidamente e disseminam-se por diversos tecidos, nomeadamente pelo rim, fígado, baço, sistema nervoso central, olhos e trato genital (Greene et al. 2012).

Segundo De Brito et al. (2018), a adesão de bactérias do género *Leptospira* às células endoteliais altera a permeabilidade do endotélio, conduzindo às manifestações hemorrágicas que ocorrem na doença. As lesões do endotélio e a ativação plaquetária desencadeada pelo LPS bacteriano podem resultar em edema e vasculite, bem como em coagulação intravascular disseminada. Estas manifestações estão associadas à síndrome de resposta inflamatória sistémica e à ocorrência de sépsis (Goldstein 2010; Greene et al. 2012).

A colonização renal é a que ocorre com mais frequência em cães infetados, verificando-se a replicação das bactérias nas células epiteliais dos túbulos renais (Greene et al. 2012). A persistência das bactérias nos túbulos renais conduz à produção de citocinas, ao recrutamento de células inflamatórias, à necrose e apoptose das células epiteliais e à nefrite aguda (Goldstein 2010; Schuller et al. 2015). A inflamação renal leva a dificuldades na perfusão do órgão o que resulta na diminuição da taxa de filtração glomerular. Por outro lado, a invasão do endotélio induz alterações nos capilares renais, resultando em lesões isquémicas no parênquima renal. As alterações renais podem ainda ser associadas à citotoxicidade do LPS e de outros componentes da membrana externa. Caso o animal recupere e elimine por

completo o agente do seu organismo, existe uma elevada probabilidade de apresentar sequelas e lesões irreversíveis, nomeadamente nefrite intersticial. Por outro lado, alguns animais ficam cronicamente infetados, especialmente quando infetados com o serovar Canicola, eliminando bactérias pela urina (Goldstein 2010; Greene et al. 2012).

O segundo órgão mais afetado pela leptospirose é o fígado, verificando-se necrose centrolobular, lesão dos hepatócitos, edema periportal, infiltração de células inflamatórias, proliferação das células de Kupffer e ainda oclusão do ducto e canalículos biliares (Goldstein 2010; Schuller et al. 2015). As alterações hepáticas podem ser a única manifestação da doença, como demonstrado num estudo publicado em 2018, que relatou 10 casos de cães diagnosticados com leptospirose que apresentavam hepatite crónica sem sinais de alterações renais, concluindo que a leptospirose deve ser considerada como um diagnóstico diferencial em animais que exibam apenas sintomatologia hepática (McCallum et al. 2018).

Os pulmões podem sofrer lesões agudas relacionadas com as toxinas libertadas pelas *Leptospira* spp., não se verificando, no entanto, a colonização do tecido pulmonar por estas bactérias. As manifestações mais frequentes prendem-se com a hemorragia e edema pulmonares que derivam das alterações sofridas pelo endotélio (Goldstein 2010; Greene et al. 2012; De Brito et al. 2018). Em humanos está descrito a síndrome de hemorragia pulmonar resultante de leptospirose, no entanto, em cães o relato de casos semelhantes só foi publicado por Klopfleisch et al. (2010).

4. Imunidade

A primeira linha de defesa a ser acionada pelo hospedeiro é a da imunidade inata, cujo papel passa pelo reconhecimento da *Leptospira* spp. como agente estranho ao organismo e a sua eliminação. No entanto, a eficácia desta linha contra bactérias patogénicas do género *Leptospira* é muito menor do que em relação a bactérias saprófitas do mesmo género (Fraga et al. 2015).

Na imunidade adquirida, a via humoral é de extrema importância para o combate efetivo desta infeção. No caso da leptospirose, a maioria dos anticorpos são direcionados para o LPS ou para componentes do mesmo, sabendo-se que a imunização passiva com anticorpos poli ou monoclonais contra esta endotoxina confere proteção contra a doença (Adler and Motezuma 2010; Fraga et al. 2015).

Os anticorpos produzidos aquando da infeção por *Leptospira* spp. são essenciais à fagocitose das bactérias pelos neutrófilos e macrófagos, uma vez que esta só é efetiva quando as bactérias são opsonizadas pelas Imunoglobulinas G (IgG). Além disto, os anticorpos são ainda essenciais à aglutinação de *Leptospira* spp. e para a ativação do sistema de complemento pela via clássica (Banfi et al. 1982).

Em cães o aumento da concentração de Imunoglobulina M (IgM) é detetado desde a segunda metade da primeira semana após infecção, atingindo o seu máximo durante a segunda semana (Lança, 2011). Após este período, os títulos de IgM vão diminuindo e a produção de IgG é observada, aumentando gradualmente ao longo de dois a três meses.

O papel da imunidade celular na leptospirose carece de mais estudos, no entanto, foi relatado que estas bactérias podem ser associadas ao complexo maior de histocompatibilidade dos macrófagos (MHC) e, mais tarde, apresentadas aos linfócitos CD8+ (Guo et al. 2010; Li et al. 2010). Além disto, as mesmas podem ser eliminadas através da fagocitose, sendo os neutrófilos os principais intervenientes (Eshghi et al. 2012).

O facto destas bactérias terem capacidade para infetar virtualmente todos os vertebrados e apresentarem um longo período de bacteriemia deve-se sobretudo à sua capacidade de evasão ao sistema imunitário do hospedeiro, mais concretamente ao sistema de complemento, através de vários mecanismos como a incorporação de reguladores do complemento ou a modulação da cascata de ativação do mesmo (Fraga et al. 2011; Vernel-Pauillac and Werts 2018).

5. Diagnóstico

5.1. Anamnese e Sinais Clínicos

Cães machos e jovens, com acesso ao exterior e com possível contacto com fontes de água e animais silvestres são os fatores mais comumente encontrados na história pregressa de animais com leptospirose (Greene et al. 2012).

Os sinais clínicos manifestados pelos animais com leptospirose dependem da imunidade do hospedeiro, da virulência do serovar infetante e ainda das condições ambientais às quais os dois intervenientes são sujeitos (Greene et al. 2012).

A infecção hiperaguda ocorre devido a leptospirose massiva, levando à morte sem sinais clínicos prévios.

Por sua vez, as infeções agudas exibem como primeiros sinais clínicos a pirexia (39,5°C a 40°C) e tremores. Outros sinais como vômitos, desidratação, linfadenopatia generalizada, dor muscular e dor à palpação abdominal vão surgindo no decorrer da doença (Greene et al. 2012; Sykes 2014). As alterações na coagulação e as lesões vasculares conduzem ao aparecimento de hematemese, hematoquezia, melena, epistaxis e petéquias. Os cães podem ainda exibir taquipneia, pulsos fracos e irregulares e ainda aumento do tempo de repleção capilar, sendo que em estado terminal se encontram hipotérmicos. É importante realçar que nas infeções agudas o rápido desenvolvimento da doença não permite o aparecimento de sinais relacionados com a insuficiência hepática ou renal (Greene et al. 2012).

Os cães com infeções subagudas por *Leptospira* spp. apresentam anorexia, letargia, vômito, diarreia, desidratação e polidipsia. A perda de peso ocorre com bastante frequência,

podendo estar associada a azotemia. A palpação abdominal destes animais pode ser dolorosa e os rins podem apresentar-se normodimensionados ou ligeiramente maiores que o normal.

A infecção por *Leptospira* spp. conduz a insuficiência renal, sendo que os cães podem exibir oligúria ou anúria nos estadios avançados da doença. A função renal nestes animais pode retomar o estado normal, no entanto, muitos cães desenvolvem doença renal crônica. A poliúria e a polidipsia exibidas por estes animais podem ser compensatórias, devido à insuficiência renal, ou ainda devido à resistência à ação da hormona antidiurética (ADH) por parte do nefrônio (Greene et al. 2012; Sykes 2014). Os cães com leptospirose podem apresentar as mucosas congestionadas, no entanto, nos casos em que a inflamação do fígado leva a colestase intra-hepática e necrose, é comum a observação das mucosas ictericas. Os animais que apresentem hepatite ativa ou fibrose hepática devido à leptospirose podem apresentar anorexia, perda de peso, ascite, icterícia ou encefalopatia hepática (Greene et al. 2012).

O envolvimento pulmonar nesta doença pode conduzir ao aparecimento de sinais como dispneia, taquipneia ou tosse, devido a hemorragia e/ou edema pulmonar. Por exemplo, um estudo realizado por Kohn et al. (2010) descreveu que 38% dos cães apresentavam dispneia aquando do internamento e que esta correlaciona-se negativamente com a sobrevivência dos animais.

Um estudo realizado por Tangeman e Littman (2013) identificou que, em 51 casos de leptospirose, os estímulos iatrotópicos mais comuns foram a anorexia (29 cães), a letargia (22 cães), o vômito (21 cães) a poliúria e polidipsia (12 cães), a diarreia (6 cães), a perda de peso (4 cães), o estado anúrico (2 cães), a dispneia (1 cão) e a ataxia (1 cão).

5.2. Hemograma

As alterações mais frequentemente encontradas no hemograma de cães com leptospirose incluem a anemia não regenerativa e a trombocitopenia. A anemia observada em casos de leptospirose pode ser explicada pela hiperhidratação em casos de anúria/oligúria; pela diminuição da produção de eritrócitos devido ao desenvolvimento de doença renal crônica; ou devido à perda de sangue por trombose ou hemorragia pulmonar ou do trato gastrointestinal (Greene et al. 2012). O desenvolvimento de trombocitopenia pode resultar do aumento do consumo de plaquetas através da ativação e agregação das mesmas devido às lesões sofridas pelo endotélio ou do consumo por causas imunomediadas. Num estudo realizado por Barthélemy et al. (2017), 83% dos cães infetados por *Leptospira* spp. exibiam alterações na coagulação e 23% apresentavam coagulação intravascular disseminada (CID).

Em relação às células da linha branca, durante a fase de leptospirose é comum verificar-se leucopenia que, nos estadios mais avançados da doença, evolui para leucocitose com desvio à esquerda (Greene et al. 2012). Segundo Reagan e Sykes (2019), a linfopenia pode ser também encontrada em casos de leptospirose.

5.3. Análises bioquímicas

Os achados mais comumente encontrados nas análises bioquímicas estão diretamente relacionados com as lesões renais e hepáticas que ocorrem no desenvolvimento de leptospirose. A azotemia, isto é, o aumento da concentração de ureia e creatinina, está presente em 80 a 100% dos cães com leptospirose, enquanto o aumento das concentrações das enzimas hepáticas verifica-se apenas em 50% dos casos. No entanto, é possível que os cães infectados exibam alterações nas bioquímicas hepáticas sem azotemia (McCallum et al. 2018; Reagan and Sykes 2019).

As lesões hepáticas traduzem-se num aumento da concentração de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FAS) e bilirrubina. O aumento de FAS é geralmente superior ao aumento da ALT e o aumento da bilirrubina é proporcional ao grau de insuficiência hepática. A concentração de bilirrubina no soro atinge o seu máximo entre o sexto e oitavo dia de infecção, sendo que a bilirrubinúria precede, geralmente, a hiperbilirrubinemia (Greene et al. 2012).

A hipoalbuminemia é um achado bastante frequente, estando relacionada com a proteinúria, com a diminuição da produção de albumina devido à insuficiência hepática e com a anorexia (Tangeman and Littman 2013).

As alterações eletrolíticas são também frequentes, verificando-se a ocorrência de hiponatremia, hipocloremia e hiperfosfatemia.

5.4. Urinálise

As alterações mais frequentemente encontradas na urinálise de cães com leptospirose incluem a isostenúria, hipostenúria, proteinúria, bilirrubinúria e glicosúria. Estes animais exibem um rácio proteína:creatinina urinário (UPC) aumentado e um sedimento urinário constituído por proteínas de baixo peso molecular, indicando que as mesmas têm origem nos túbulos renais e não no glomérulo (Greene et al. 2012; Sykes 2014).

O sedimento urinário de cães infectados pode apresentar, embora menos frequentemente, cilindros, leucócitos e eritrócitos (Mastrorilli et al. 2007).

5.5. Diagnóstico imagiológico

5.5.1. Diagnóstico radiográfico

Tendo em conta que no decorrer da leptospirose existe com alguma frequência o desenvolvimento de sintomatologia respiratória, a realização de radiografias torácicas deve ser praticada de forma a detetar alterações. As alterações radiográficas a nível torácico verificam-se em 50 a 70% dos casos de leptospirose, podendo ser acompanhadas de sinais clínicos respiratórios ou não (Kohn et al. 2010; Knöpfler et al. 2017; Reagan and Sykes 2019). Segundo Tangeman e Littman (2013), as alterações mais frequentemente encontradas incluem

a presença de padrão intersticial, derrame pleural, padrão alveolar, padrão vascular e ainda linfadenopatia. É importante realçar que, como demonstrado por Knöpfler et al. (2017), a presença de alterações na imagem radiográfica de tórax é compatível com uma maior probabilidade de morte dos animais.

A presença de esplenomegalia, hepatomegalia e perda de detalhe são algumas das alterações que podem ser encontradas na imagem radiográfica de abdómen (Knöpfler et al. 2017).

5.5.2. Diagnóstico ecográfico

Apesar de alguns autores recorrerem à radiografia abdominal de forma a verificar as lesões decorrentes de leptospirose, o meio de diagnóstico complementar mais utilizado é a ecografia. Em aproximadamente 80% dos casos de leptospirose, a ecografia permite detetar alterações ao nível dos rins e do fígado, sendo as alterações mais comumente encontradas a renomegalia, a hiperecogenicidade do córtex renal, a presença de líquido na região perirenal, zonas de hiperecogenicidade medular (*medullary rim sign*), dilatação da pélvis renal, perda de diferenciação corticomedular, hepatomegalia e a hipoecogenicidade difusa do fígado com a proeminência das paredes dos vasos porta, que surgem como linhas duplas ou em forma de “*donuts*” no parênquima (Forrest et al. 1998; Greene et al. 2012; Mattoon and Nyland 2014; Pennick and d’Anjou 2015; Sonet et al. 2017; Reagan and Sykes 2019).

Diversos estudos descrevem o envolvimento da vesícula biliar durante as infeções por *Leptospira* spp., indicando alterações como a presença de lamas biliares, espessamento da parede e aumento da sua ecogenicidade e ainda a presença de mucocelo (Tangeman and Littman 2013; Knöpfler et al. 2017; Sonet et al. 2017; McCallum et al. 2018). Os mecanismos que conduzem ao desenvolvimento de mucocelo biliar nestes casos são ainda desconhecidos (Sonet et al. 2017).

A presença de líquido na região perirenal é uma alteração frequentemente encontrada em cães com diagnóstico de leptospirose, ocorrendo em 60% dos animais (Sonet et al. 2017). A acumulação de líquido verificada é, geralmente, bilateral e pode estender-se até à zona caudal do espaço retroperitoneal (Pennick and d’Anjou 2015; Sonet et al. 2017). A presença de líquido perirenal pode ser considerado um fator de prognóstico negativo em casos de insuficiência renal aguda (Holloway and O’Brien 2007).

Outros achados frequentes estão relacionados com o estado inflamatório induzido pela doença, verificando-se linfadenomegalia e hipoecogenicidade do parênquima dos linfonodos (Knöpfler et al. 2017; Sonet et al. 2017; McCallum et al. 2018). O baço pode apresentar-se aumentado e com o parênquima heterogéneo (Sykes 2014; Knöpfler et al. 2017; Sonet et al. 2017). A parede gástrica encontra-se espessada em 26% dos animais (Sonet et al. 2017). O

intestino delgado, por sua vez, pode apresentar também sinais de inflamação como espessamento da parede, alterações no peristaltismo e aumento da ecogenicidade da mucosa. Além disto, vários estudos descrevem a detecção de invaginações intestinais aquando da realização de ecografias de animais infetados com *Leptospira spp.* Os fatores que levam à ocorrência das mesmas não são ainda conhecidos, no entanto, as alterações da parede e da motilidade intestinal podem contribuir para o seu desenvolvimento (Schweighauser et al. 2009; Schulz et al. 2010; Sonet et al. 2017).

5.5.3. Tomografia axial computadorizada (TAC)

O recurso à TAC como exame complementar de diagnóstico em casos de leptospirose é muito diminuto, sendo escassas as informações relativamente à sua utilização. No entanto, os resultados de um estudo realizado por Gendron et al. (2014) mostram que as alterações mais frequentemente detetadas incluem o espessamento peribroncovascular, a bronquiectasia e a presença de zonas de consolidação que evoluem para lesões com aspeto de “vidro moído”. Segundo este estudo, a gravidade das lesões encontradas na TAC não apresenta correlação com o desfecho da doença.

5.6. Diagnóstico Sorológico

5.6.1. Teste de Aglutinação Microscópica (MAT)

O MAT é considerado o método *gold standard* de diagnóstico serológico de leptospirose. Este teste baseia-se na identificação das reações antigénio-anticorpo que se desenvolvem quando diluições seriadas do soro de um determinado animal são expostas a culturas vivas de *Leptospira spp.* contendo diferentes serogrupos. Os resultados são obtidos por microscopia de fundo escuro e expressam qual o título de anticorpos aglutinantes para cada serogrupo testado, isto é, qual a maior diluição capaz de levar à aglutinação de pelo menos 50% dos microrganismos (Greene et al. 2012).

Existem várias limitações inerentes a este teste como o facto de detetar anticorpos persistentes após infeção subclínica, fazendo com que um resultado positivo não determine a existência de doença ativa (Goldstein 2010). Outra limitação passa pela obtenção de um resultado negativo quando este teste é realizado uma única vez no estadio inicial da doença. O MAT deteta IgG e IgM aglutinantes e o período de seroconversão aquando da infeção por *Leptospira spp.* tem uma duração de sete a nove dias, o que pode levar a falsos negativos caso o teste seja realizado precocemente (Greene et al. 2012; Niloofa et al. 2015). Desta forma, recomenda-se a realização de um novo MAT, sete a catorze dias após o primeiro, o que aumenta a sensibilidade do teste de 50% para 100% e ajuda na distinção entre os casos de serologia positiva por vacinação ou por doença ativa. Um aumento de quatro vezes da titulação inicial é compatível com a presença de infeção ativa (Greene et al. 2012; Fraune et

al. 2013; Schuller et al. 2015).

Animais vacinados tendem a apresentar titulações inferiores a 1:800 para os serovares abrangidos pela vacina, sendo que estas diminuem quatro meses após a vacinação (Sykes 2014). Animais previamente infetados por *Leptospira* spp. apresentam, geralmente, titulações inferiores a 1:800, no entanto, estas podem persistir durante pelo menos um ano (Sykes 2014). Desta forma, em animais não vacinados recentemente e com sinais compatíveis com leptospirose, titulações iguais ou superiores a 1:800 podem levar apenas ao diagnóstico presuntivo de leptospirose. O diagnóstico definitivo só é conseguido quando as titulações obtidas no MAT em situações de convalescença são quatro vezes superiores às iniciais, como mencionado anteriormente (Greene et al. 2012).

É importante destacar que cães vacinados podem apresentar titulações moderadas para serogrupos não incluídos na vacina administrada e sem que tenha havido exposição natural aos mesmos. Este último fator verifica-se devido à imunidade cruzada após vacinação (Sykes 2014; Bouvet et al. 2020).

A interpretação dos resultados obtidos no MAT está dependente da exposição basal da população à leptospirose, do estado vacinal do animal, da existência de infeção prévia e ainda do estado clínico do animal (Greene et al. 2012; Reagan and Sykes 2019).

O MAT, apesar de bastante acessível, é um teste de difícil interpretação e execução, estando os operadores em contacto com bactérias com potencial zoonótico.

Apesar das limitações previamente mencionadas, este teste apresenta-se como a melhor opção de diagnóstico sorológico se executado corretamente.

5.6.2. Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA)

Ao longo do tempo vários protocolos de ELISA têm sido desenvolvidos com o objetivo de detetarem anticorpos específicos em cães infetados por *Leptospira* spp. (Dey et al. 2004; Dey et al. 2007; Niloofa 2015). A maior vantagem associada a este teste prende-se com o facto de não serem necessárias colónias vivas destas bactérias durante a sua execução, o que diminui o risco associado ao teste quando comparado com o MAT.

As bactérias do género *Leptospira* apresentam diversas proteínas na membrana externa (OMPs), sendo a lipL32 a que existe em maior quantidade. Desta forma, os ensaios de imunoabsorção são realizados recorrendo à clonagem desta proteína que existe apenas em bactérias patogénicas deste género e com base nas interações entre a mesma e o soro de animais suspeitos de infeção (Greene et al. 2012; Vedhagiri et al. 2013).

O teste de ELISA é passível de detetar a presença de IgM ou IgG, considerando-se o teste positivo quando as titulações são superiores a 1:200.

É de extrema importância destacar que, ao contrário do que acontece com as IgM avaliadas por MAT e ELISA, as titulações de IgG obtidas por ELISA aumentam muito após

vacinação e mantêm-se elevadas durante vários meses. Desta forma, a medição concomitante de IgG e IgM através do teste de ELISA permite distinguir de forma mais eficiente a presença de anticorpos derivados de vacinação ou de infecção natural, sendo que cães vacinados exibem titulações de IgG elevadas com títulos de IgM baixos ou negativos (Greene et al. 2012).

Vários estudos procuraram determinar qual a sensibilidade e especificidade dos ensaios de imunoabsorção, obtendo-se valores que oscilam entre os 48 a 100% e os 87 a 98%, respetivamente (Effler et al. 2002; Kucerova et al. 2011; Niloofa et al. 2015). Tendo em conta a disparidade entre valores, a realização deste teste como forma de diagnóstico definitivo de leptospirose não é recomendada, sendo a sua realização sobretudo útil quando outros testes mais morosos, como o MAT ou o PCR (polymerase chain reaction), não garantem um resultado em tempo útil (Reagan and Sykes 2019).

5.6.3. Testes rápidos

Diversos testes rápidos com capacidade para detetar IgM e/ou IgG têm sido desenvolvidos e avaliados com o objetivo de serem utilizados como meio de diagnóstico na leptospirose (Curtis et al. 2015; Winzelberg et al. 2015; Kodjo et al. 2016; Azócar-Aedo et al. 2017; Lizer et al. 2017; Gloor et al. 2017; Lizer et al. 2018; Troia et al. 2018). Apesar dos estudos realizados, o MAT continua a ser considerado o meio diagnóstico de eleição para a leptospirose, sendo que os testes rápidos apresentam-se como uma solução rápida, conveniente e fácil de utilizar que permitem obter um diagnóstico presuntivo para instituição de tratamento enquanto se aguarda pelos resultados do MAT (Troia et al. 2018).

É importante realçar que um teste rápido permite a obtenção de resultados num curto espaço de tempo, o que não significa que consiga detetar a doença nos estadios iniciais (Picardeau et al. 2014).

As técnicas de ELISA e imunocromatografia são as mais frequentemente utilizadas nos testes rápidos desenvolvidos para a espécie canina.

A técnica de ELISA baseia-se na deteção de anticorpos contra a proteína lipL32, proteína esta que permite a ligação de IgG e IgM mas apresenta uma maior afinidade para a deteção de IgG, sendo a janela de utilização ótima duas a três semanas depois do início da infecção (Lizer et al. 2018).

O teste rápido de ELISA mais utilizado na prática clínica é denominado SNAP Lepto (IDEXX Laboratories, Westbrook, ME, USA), teste este que pode detetar a presença de anticorpos vacinais um ano após a vacinação, como demonstrado por Curtis et al. (2015).

Os testes rápidos que se baseiam na técnica de imunocromatografia utilizam extratos de *Leptospira* spp. como antigénios de forma a detetarem a presença de IgM em soros caninos (Kodjo et al. 2016).

Um dos testes rápidos por imunocromatografia mais utilizados é o Witness Lepto (Zoetis, Parsippany-Troy Hills, NJ, USA). A detecção de anticorpos vacinais através da imunocromatografia só se verificou em 23% dos animais 12 semanas após a vacinação, sendo que às 26 semanas todos estes animais apresentavam titulações negativas de IgM (Lizer et al. 2017).

A sensibilidade e especificidade dos testes serológicos estão bastante dependentes do estadio de infecção e da resposta imunitária gerada pelos hospedeiros, o que justifica a variabilidade dos valores obtidos (Azócar-Aedo et al. 2017). Posto isto, um estudo realizado por Lizer et al. (2018) procurou comparar o desempenho dos testes rápidos por ELISA e imunocromatografia entre si e com o MAT. Os resultados indicaram que o teste de imunocromatografia apresentava um melhor desempenho, tendo identificado anticorpos específicos para *Leptospira* spp. em 87,5% dos cães ao sétimo dia após infecção, seguido pelo MAT que detetou 65,6% dos animais infetados. Por sua vez, o teste rápido por ELISA detetou anticorpos em apenas um cão no mesmo tempo após infecção. A detecção precoce de anticorpos conseguida através do teste de imunocromatografia e MAT pode ser explicada pelo desenvolvimento de IgM ocorrer a partir da primeira semana após infecção, enquanto o desenvolvimento de IgG, imunoglobulina detetada nos testes rápidos de ELISA, ocorre nas semanas seguintes.

5.7. Diagnóstico por PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

A técnica laboratorial de PCR é uma ferramenta que permite o diagnóstico molecular de leptospirose através da detecção de ADN proveniente de *Leptospira* spp. em amostras do animal infetado (Reagan and Sykes 2019).

As amostras mais comumente analisadas são o sangue e a urina, no entanto, o PCR pode ser também executado em tecidos, como o tecido renal e pulmonar. No caso da amostra escolhida ser sangue, recomenda-se que a sua análise seja realizada durante os primeiros dez dias de infecção, momento este em que decorre a fase de bacteriemia. Tendo em conta que a eliminação de *Leptospira* spp. através da urina ocorre após a primeira semana de infecção, a análise deste tipo de amostra deve ser realizada nesse período. Uma vez que a data de início de infecção é frequentemente desconhecida, é usual o envio de amostras de sangue e urina em simultâneo de forma a aumentar a sensibilidade deste teste (Greene et al. 2012; Reagan and Sykes 2019). O diagnóstico por PCR passa pela identificação de genes pertencentes às bactérias patogénicas do género *Leptospira* (genes *secY*, *lfb1*, *lipL32* ou *lig*), sendo por isso um teste que não permite a distinção entre os diferentes serogrupos ou serovares, o que, no entanto, não influencia a abordagem clínica (Rojas et al. 2010; Cermakova et al. 2013; Xu et al. 2014).

A principal utilidade do PCR prende-se com a sua capacidade de detetar a presença de ADN proveniente de bactérias do género *Leptospira* antes da ocorrência de seroconversão, revelando-se um teste importante para o diagnóstico precoce de infecção (Miotto et al. 2018b;

Reagan and Sykes 2019). Outra aplicação do PCR está relacionada com a identificação de portadores crónicos, animais estes que se apresentam assintomáticos e que não apresentam necessariamente anticorpos contra esta bactéria (Zaidi et al. 2018; Goy-Thollot et al. 2018; Miotto et al. 2018a). Este teste apresenta também algumas limitações, relacionadas nomeadamente com a eliminação intermitente de *Leptospira* spp. pela via urinária em animais cronicamente infetados, o que pode conduzir a falsos negativos. Falsos negativos podem ainda surgir no caso da carga bacteriana ser reduzida devido à fase da infeção, à resposta imunitária ou ainda devido ao uso de antibióticos (Reagan and Sykes 2019).

O diagnóstico por PCR é sobretudo vantajoso em relação ao MAT quando os animais testados foram vacinados recentemente uma vez que a vacinação não induz um resultado positivo no PCR (Midence et al. 2012).

Um estudo realizado por Riediger et al. (2017) demonstrou que a sensibilidade do PCR realizado em amostra de sangue nos seis primeiros dias de infeção é de 86% e a especificidade do mesmo é de 99%. Outro estudo concluiu que a sensibilidade e especificidade do PCR na urina é de 100% e 88,3%, respetivamente (Harkin et al. 2003).

5.8. Diagnóstico Bacteriológico

A cultura e isolamento de bactérias do género *Leptospira* é considerado um diagnóstico definitivo de infeção, no entanto, o facto de ser um processo extremamente demorado e pouco acessível determina a sua pouca utilização.

As amostras de sangue ou urina devem ser obtidas de forma asséptica e antes da implementação de terapêutica antimicrobiana, sendo enviadas para o laboratório refrigeradas (Greene et al. 2012).

Tendo em conta os factos previamente mencionados, a cultura de bactérias do género *Leptospira* não é um meio de diagnóstico viável na prática clínica uma vez que não permite um diagnóstico atempado (Reagan and Sykes 2019).

6. Tratamento

6.1. Antibioterapia

A antibioterapia deve ser implementada o mais rapidamente após a suspeição de leptospirose, ainda antes da obtenção dos resultados dos diferentes meios de diagnóstico, uma vez que estes fármacos inibem a multiplicação de *Leptospira* spp., reduzindo as probabilidades do animal desenvolver complicações derivadas da infeção, como insuficiência hepática ou renal (Greene et al. 2012).

Os antibióticos recomendados para o tratamento da leptospirose são os derivados da penicilina e a doxiciclina. A doxiciclina demonstrou ser capaz de eliminar estas bactérias em três dias dos tecidos, incluindo o rim, de hamsters experimentalmente infetados, sendo que a

ampicilina demonstrou uma menor eficácia (Truccolo et al. 2002). Desta forma, recomenda-se que o tratamento da leptospirose no cão passe pela administração de doxiciclina por via oral e acompanhada de alimento (Sykes et al. 2011). Tendo em conta que a maioria dos cães afetados por esta infeção apresentam vômitos e anorexia no início da doença, este fármaco deve ser substituído pela ampicilina administrada por via parenteral (10-20mg/kg a cada 6 ou 8 horas). Uma vez retomada a alimentação, o tratamento com doxiciclina oral (10 mg/kg a cada 24 horas) deve ser iniciado e mantido por duas semanas mesmo que o animal apresente insuficiência renal pois este antibiótico não apresenta um efeito nefrotóxico considerável (Greene et al. 2012; Argyle et al. 2017).

A utilização de fluoroquinolonas no tratamento de leptospirose não é usual, no entanto, um estudo realizado por Gutierrez et al. (2019) demonstrou que a administração parenteral de cloridrato de enrofloxacina di-hidratada permite a obtenção de resultados negativos de PCR após três a cinco dias do início da terapêutica em 82,2% dos cães. Apesar deste estudo, o uso de fluoroquinolonas deve ser evitado de forma a diminuir a resistência de outras bactérias a estes antibióticos (Sykes et al. 2011). Por outro lado, os aminoglicosídeos demonstraram uma elevada eficácia na eliminação das bactérias dos túbulos renais, no entanto, tendo em conta a sua elevada nefrotoxicidade, estes antibióticos devem ser evitados em animais cujos resultados de função renal não sejam normais (Greene et al. 2012).

6.2. Tratamento de suporte

O tratamento de suporte depende da gravidade da infeção e das consequências que a mesma apresenta nomeadamente a nível renal, hepático e gastrointestinal (Greene et al. 2012).

Frequentemente animais com leptospirose apresentam-se desidratados ou em choque, sendo de extrema importância iniciar um protocolo de fluidoterapia que permita restabelecer o equilíbrio de fluídos, eletrólitos e ácido-base (Schuller et al. 2015).

Cães que apresentem oligúria ou anúria devem ser reidratados com recurso a soluções cristalóides isotónicas tendo em conta o seu peso, taxa de desidratação e possíveis perdas de fluídos e eletrólitos através do vômito e diarreia. Caso este procedimento não reverta a produção diminuída de urina, diuréticos osmóticos como o manitol podem ser administrados por via endovenosa de forma a aumentar a taxa de filtração glomerular. Os diuréticos osmóticos podem não ser suficientes, recorrendo-se à administração de furosemida que se mostra sobretudo útil em casos de hiperhidratação ou hipercalemia (Langston 2017).

O protocolo de fluidoterapia implementado deve ser adaptado ao *output* de urina do animal, tendo principal atenção à possível hiperhidratação iatrogénica uma vez que esta conduz a maiores complicações a nível pulmonar e gastrointestinal, bem como ao aumento da pressão a nível renal o que pode comprometer a perfusão destes órgãos e a taxa de filtração

glomerular. Além disto, após reidratação é frequente que os animais se apresentem poliúricos, sendo de extrema importância vigiar a perda de eletrólitos por via urinária (Schuller et al. 2015).

Os animais que sejam refratários aos protocolos previamente mencionados devem ser submetidos a diálise. Este procedimento está indicado em cães cuja produção de urina esteja diminuída e que apresentem sinais de hiperhidratação, cães que apresentem hipercalemia ou concentrações de ureia superiores a 80 mg/dl ou animais cujos sinais de uremia não sejam responsivos ao tratamento médico (Sykes et al. 2011). É importante clarificar que a diálise não tem um papel direto no restauro da função renal, tendo como função restabelecer o equilíbrio de fluídos, eletrólitos e ácido-base (Schuller et al. 2015).

Um estudo relatou que 86% dos cães com leptospirose e azotemia grave que se mostraram refratários ao tratamento médico sobreviveram após serem submetidos a diálise (Adin and Cowgill 2000). O restabelecimento da função renal ocorre duas a quatro semanas após o início da diálise, verificando-se frequentemente que apenas um a três tratamentos são suficientes para a recuperação renal (Sykes 2014).

Não obstante as visíveis vantagens associadas ao recurso ao procedimento de diálise, a sua disponibilidade na Medicina Veterinária é ainda diminuta, justificando a sua pouca utilização.

Os cães infetados com *Leptospira* spp. exibem frequentemente vômito e gastrite consequentes da azotemia, devendo a alimentação por via oral ser descontinuada nestes animais, instituindo-se a nutrição parenteral. Desta forma, antieméticos e protetores gástricos devem ser administrados por via parenteral. Por outro lado, em cães que não apresentem náusea ou vômitos, mas que exibam anorexia, a colocação de um tubo de alimentação é uma solução que garante o suporte nutricional do animal com o mínimo de complicações (Greene et al. 2012; Schuller et al. 2015).

A hemorragia pulmonar é uma manifestação grave de leptospirose cuja patogenia é ainda desconhecida, desta forma os tratamentos mais utilizados são meramente sintomáticos e incluem a minimização das manipulações do animal, a oxigenoterapia e ainda evitar o desenvolvimento de hipertensão sistémica, de hiperhidratação e de hipervolemia. Por outro lado, a transfusão de plasma ou de sangue inteiro só apresentam vantagens em animais com alterações hemostáticas (Meudre et al. 2008; Schuller et al. 2015).

Além dos procedimentos previamente mencionados, o controlo da dor é fulcral nas fases iniciais da doença onde se verifica dor a nível renal, gastrointestinal e ainda a nível muscular e articular (Schuller et al. 2015).

7. Monitorização

Os cães infetados com *Leptospira* spp. devem ser referenciados para um Centro de Atendimento Médico-Veterinário (CAMV) com cuidados permanentes devido à monitorização intensa e internamento em isolamento que estes casos exigem.

Análises bioquímicas que permitam a monitorização da função renal, das enzimas hepáticas, da concentração de proteínas e do equilíbrio ácido-base e eletrolítico devem ser realizadas a cada 24 horas no caso de infeção aguda. Durante a hospitalização recomenda-se a realização de hemograma a cada 48 horas, sendo que em casos graves o hematócrito deve ser avaliado de 24 em 24 horas (Sykes et al. 2011).

Por outro lado, é de extrema importância monitorizar o estado de hidratação do animal bem como a produção de urina do mesmo. De forma a evitar o desenvolvimento de hiperhidratação, a frequência respiratória, a auscultação cardiopulmonar e ainda a pressão arterial devem ser avaliadas nestes animais. A algaliação dos cães hospitalizados em sistema fechado permite a medição da produção de urina, que deve ser monitorizada a cada hora (Sykes 2014).

O estadiamento da insuficiência renal aguda através do sistema de classificação elaborado pela *International Renal Interest Society* (IRIS) tem como objetivo facilitar o diagnóstico e a tomada de decisões terapêuticas, como o recurso a diálise. Os cinco estadios (I, II, III, IV, V) contemplados neste sistema baseiam-se na medição de creatinina sanguínea e no volume de urina produzido, apresentando algum valor prognóstico (Cowgill 2016).

Após a alta médica, recomenda-se que a reavaliação destes animais seja realizada no espaço máximo de uma semana, realizando-se um painel de análises bioquímicas completo bem como um hemograma e medição da densidade urinária (Sykes et al. 2010).

A recuperação da função renal pode continuar durante vários meses após a estabilização do animal, sendo que este período não requer hospitalização a menos que não se consiga manter a hidratação ou o suporte nutricional. Aliás, um estudo relatou que 50% dos cães que sobreviveram à fase aguda da leptospirose exibiam alterações na função renal mais de um ano após a alta médica (Kis et al. 2012). Caso a infeção por *Leptospira* spp. resulte em doença renal crónica, os animais devem ser estadiados de acordo com o sistema de classificação desenvolvido pela IRIS, sendo primordial a medição da concentração de creatinina, bem como a medição do rácio UPC e da pressão arterial (IRIS 2019).

Desta forma, as consultas de reavaliação devem ser realizadas até estabilização clínica, sendo realizadas a cada uma ou três semanas. Estes controlos devem incluir a medição da pressão arterial, análises bioquímicas, hemograma e ainda urianálise (Schuller et al. 2015).

8. Prognóstico e Mortalidade

A taxa de mortalidade associada à leptospirose apresenta valores entre 19 a 58% (Birnbbaum et al. 1998; Carr et al. 2002; Miller et al. 2007; Geisen et al. 2007; Mastrorilli et al. 2007; Kohn et al. 2010; Major et al. 2014; Knöpfler et al. 2017; Barthélemy et al. 2017). Quando o tratamento é iniciado precocemente e de forma intensiva, o prognóstico de recuperação em casos de leptospirose aguda aumenta, sendo que o recurso a diálise em animais com azotemia grave permite a obtenção de taxas de sobrevivência na ordem dos 80% (Adin and Cowgill 2000).

Um estudo realizado por Kohn et al. (2010) implicou o desenvolvimento de alterações pulmonares no decurso da leptospirose na morte de 43% dos animais, enquanto cães sem envolvimento pulmonar apresentam uma taxa de mortalidade de 20%, sendo este um indicador de mau prognóstico (Knöpfler et al. 2017).

Por outro lado, um estudo realizado por Barthélemy et al. (2017) relatou que a taxa de mortalidade associada à hipercoagulabilidade era de 21%, sendo significativamente inferior à taxa de 57% verificada em cães com perfil de hipocoagulabilidade.

É importante realçar que as disparidades verificadas entre estudos relativamente à taxa de sobrevivência se devem a diversos fatores relacionados com o nível de recursos disponíveis consoante o país, o CAMV e os tutores, nomeadamente o acesso a hospitalização em regime intensivo e acesso a diálise (Grayzel and DeBess 2016).

Os indicadores de mau prognóstico mais frequentemente relatados em estudos prendem-se com as concentrações elevadas de creatinina e ureia (Rentko et al. 1992; Birnbbaum et al. 1998; Adin and Cowgill 2000; Knöpfler et al. 2017). Outros estudos realçaram a importância do rácio UPC como indicador de mau prognóstico, ao invés da creatinina (Mastrorilli et al. 2007; Greene et al. 2012).

A trombocitopenia e a bilirrubinemia são igualmente apontadas como indicadoras de mau prognóstico (Carr et al. 2002; Knöpfler et al. 2017).

Outros indicadores de mau prognóstico incluem a leucocitose, a oligúria, alterações no eletrocardiograma, bem como o aumento da concentração de troponina cardíaca I (cTn1) e o aumento do rácio proteína C-reativa/haptoglobina (Geisen et al. 2007; Mastrorilli et al. 2007; Greene et al. 2012; Knöpfler et al. 2017).

9. Profilaxia

A vacinação apresenta-se como uma excelente medida profilática que permite a diminuição da prevalência da infeção, bem como a diminuição das consequências que advêm da mesma.

A utilização de vacinas atenuadas permite uma melhor imunização que as vacinas inativadas utilizadas atualmente, no entanto a pouca estabilidade das mesmas e o risco de

reversão para um estado de virulência determinou a sua substituição (Greene et al. 2012).

As primeiras vacinas a serem introduzidas eram bivalentes, garantindo a imunização contra os serogrupos Icterohaemorrhagiae e Canicola, no entanto, atualmente estão disponíveis vacinas que incluem os serogrupos Canicola, Icterohaemorrhagiae, Australis e Grippotyphosa (Greene et al. 2012; Sykes 2014; Schuller et al. 2015).

Segundo a *World Small Animal Veterinary Association* (WSAVA) a vacina deve ser administrada em cachorros a partir das 8 semanas de vida e repetida duas a quatro semanas após a primeira dose. Em cães adultos vacinados pela primeira vez recomenda-se a administração de duas doses de vacina com duas a quatro semanas de intervalo. A vacinação contra a leptospirose deve ser repetida anualmente (Day et al. 2016).

Vários estudos têm sido realizados com o objetivo de determinar o início do estabelecimento da imunidade induzida pela vacinação e a sua duração (Wilson et al. 2013a; Wilson et al. 2013b; Klaasen and Adler 2015; Bouvet et al. 2016). Um estudo realizado por Bouvet et al. (2016) concluiu que o estabelecimento de imunidade ocorre duas semanas após a vacinação com uma vacina trivalente prevenindo-se a mortalidade, o aparecimento de sinais clínicos, a eliminação de bactérias a nível renal e o desenvolvimento de um estadio de portador assintomático. A imunidade induzida pela administração da vacina quadrivalente apresenta a duração de pelo menos um ano (Wilson et al. 2013b).

A vacinação contra os serovares previamente descritos pode induzir imunidade cruzada para outros, como demonstrado por Bouvet et al. (2020).

Por outro lado, uma vez que a duração da imunidade após infeção natural é desconhecida e o animal pode ser exposto a um serovar diferente, recomenda-se que a vacinação do mesmo seja realizada o mais rapidamente possível após a recuperação clínica (Schuller et al. 2015).

Além da vacinação adequada, existem outras medidas que podem ser adotadas de modo a diminuir o risco de infeção por *Leptospira* spp., nomeadamente o controlo dos hospedeiros definitivos, mais propriamente dos roedores, e a diminuição da exposição a fontes de água (Greene et al. 2012; Schuller et al. 2015).

Outra medida passa pela prevenção da infeção de cães que coabitem com cães infetados, apesar do potencial destes animais como transmissores de infeção seja ainda desconhecido, recomendando-se assim a administração de doxiciclina durante duas semanas mesmo que estes não apresentem sintomatologia compatível com a doença (Schuller et al. 2015).

10. Saúde Pública

A infeção humana ocorre após contacto direto ou indireto com a urina de animais infetados ou com fontes de água ou solo contaminados.

Desta forma, a transmissão da doença está fortemente relacionada com fatores ambientais, nomeadamente com a precipitação, cheias, catástrofes naturais, expansão urbana descontrolada e com condições higiossanitárias precárias, apresentando prevalências muito variáveis, mas ocorrendo com maior frequência em países em desenvolvimento (Pappas et al. 2008; Schneider et al. 2015). Os fatores de risco mais frequentemente associados à leptospirose humana relacionam-se com a realização de atividades que envolvam contacto com animais silvestres e roedores, o trabalho no sector agropecuário e a prática de Medicina Veterinária (Schuller et al. 2015; Samir et al. 2015). Apesar dos roedores serem considerados a maior fonte de infeção para os humanos, a medicina baseada no conceito de “*One Health*” motivou a realização de estudos epidemiológicos que procuram definir qual o papel dos diferentes hospedeiros na transmissão zoonótica, identificando possíveis correlações entre a prevalência de leptospirose em humanos com a prevalência encontrada em vacas, porcos, cavalos e cães (Schneider et al. 2015; Guernier et al. 2016; Barragan et al. 2016; Jorge et al. 2017; Lau et al. 2017).

Os humanos, sendo hospedeiros acidentais de *Leptospira* spp., apresentam um período de eliminação destas bactérias pela via urinária muito reduzido, sendo por isso a transmissão entre humanos praticamente inexistente. Por outro lado, apesar do papel da espécie canina na transmissão zoonótica não estar totalmente esclarecido, vários estudos têm comprovado que esta espécie pode assumir o papel de portador assintomático, eliminando bactérias do género *Leptospira* pela urina durante vários meses com conseqüente contaminação do ambiente (Khorami et al. 2010; Lelu et al. 2015; Samir et al. 2015; Harkin and Hays 2016; Sant’Anna et al. 2017; Sant’Anna et al. 2018; Zaidi et al. 2018; Miotto et al. 2018a).

O estudo da prevalência na espécie canina numa determinada região é ainda importante para estimar o nível de contaminação ambiental, uma vez que estes animais estão mais frequentemente expostos a fatores de risco, podendo funcionar como sentinelas no que diz respeito à infeção humana (Gay et al. 2014; Major et al. 2014; Goarant 2016; Jorge et al. 2017).

Os tutores de cães infetados devem ser alertados para o potencial zoonótico da doença e para os fatores de risco associados à mesma de forma a evitar o contacto com as fontes de infeção às quais o seu animal foi exposto. Um estudo desenvolvido por Barmettler et al. (2011) concluiu que o desenvolvimento de titulações positivas em tutores de cães infetados por *Leptospira* spp. é raro. Por outro lado, o risco zoonótico em ambiente hospitalar foi também avaliado, concluindo-se que nenhum dos veterinários ou enfermeiros envolvidos no tratamento de cães com diagnóstico de leptospirose era seropositivo para esta doença. Não obstante os resultados obtidos neste estudo, recomenda-se a implementação de medidas de higiene e segurança que visem diminuir o risco de transmissão (Tabela 2) (Schuller et al.

2015). O panorama em Portugal relativamente à Leptospirose humana foi alvo de estudo em 2006, verificando-se a existência de 1024 casos de infeção e 183 mortes durante um período de 18 anos. O mesmo estudo verificou que a taxa de incidência média no arquipélago dos Açores era muito superior à encontrada no arquipélago da Madeira e em Portugal continental (Vieira et al. 2006).

Sendo considerada uma Doença de Declaração Obrigatória, os dados mais recentemente publicados pela Direção Geral de Saúde (2017) registam a notificação de 105 casos de Leptospirose Humana no ano de 2016.

Tabela 2 - Recomendações de higiene e segurança em ambiente hospitalar (adaptado de Schuller et al. 2015).

Iniciar antibioterapia o mais rápido possível de forma a interromper a eliminação de bactérias
Desinfetar superfícies que estejam em contacto com animais infetados ou com a urina dos mesmos
Internar os cães infetados em isolamento e evitar a circulação dos mesmos no hospital
Recorrer à algaliação de forma e evitar a contaminação do ambiente com a urina do paciente
Lavar as mãos antes e após o contacto com cães infetados
Utilizar material de proteção pessoal como luvas, bata descartável, máscara e óculos zonas contaminadas
Inativar a urina de cães infetados com desinfetante
Considerar o sangue e a urina de cães infetados resíduos hospitalares

Parte III - Leptospirose canina: estudo retrospectivo sobre a relação entre as alterações hematológicas, achados ecográficos e desfecho clínico

1. Objetivos do estudo

Este estudo incidiu sobre uma amostra de população canina naturalmente infetada com leptospirose e teve como objetivos analisar:

- As características da amostra quanto à idade no momento do diagnóstico, o sexo, e a raça.

- As características da amostra quanto ao estado de vacinação, estilo de vida, realização de atividades como a caça e ainda ao contacto com roedores, animais silvestres ou fontes de água.

- A frequência dos diferentes estímulos iatrogênicos bem como dos dados de anamnese e das alterações verificadas no exame físico.

- A frequência de recurso a cada um dos testes diagnósticos ao dispor, nomeadamente recurso ao MAT e ELISA, e ainda análise dos resultados obtidos.

- As alterações nos resultados do hemograma e das análises bioquímicas no dia de apresentação à consulta.

- A existência de uma possível relação entre a presença de trombocitopenia e o desfecho clínico dos casos.

- A frequência do recurso à urianálise e análise dos seus resultados.

- As alterações verificadas no exame ecográfico, com maior destaque para as alterações exibidas a nível renal e hepático.

- A existência de uma possível relação entre as alterações verificadas nas análises bioquímicas, nomeadamente na concentração de ureia, creatinina, FAS e ALT e a presença de alterações no exame ecográfico.

- A existência de uma possível relação entre as alterações verificadas no exame ecográfico com o desfecho do caso clínico.

- O recurso à diálise.

- A frequência de desenvolvimento de quadro pulmonar e/ou oligúria/anúria durante a hospitalização, bem como avaliar a possível relação entre o desenvolvimento destes quadros e o desfecho do caso clínico.

- A frequência de alta médica, ou por outro lado, ocorrência de morte natural ou por eutanásia bem como as causas da mesma.

2. Materiais e Métodos

2.1. Amostragem

A amostra do nosso estudo é constituída por 17 cães (N=17) diagnosticados com leptospirose no Hospital Veterinário do Atlântico durante um período de quatro anos (março de 2014 a março de 2018).

2.2. Critérios de Inclusão

No estudo foram incluídos todos os canídeos com diagnóstico positivo de leptospirose, considerando-se um caso positivo quando se verificou:

-Títulos no teste de ELISA de IgM e/ou IgG superiores a 1:200 sem história de vacinação há pelo menos 12 meses.

-PCR de sangue e/ou urina positivo com ou sem história de vacinação.

Além disto, todos os animais deviam apresentar registo completo das suas informações básicas, dados de anamnese, sinais clínicos, meios de diagnóstico utilizados e ainda uma descrição detalhada das alterações verificadas no exame ecográfico bem como o desfecho do caso clínico.

2.3. Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo todos os animais vacinados com suspeita de leptospirose cujo teste de diagnóstico escolhido não tenha sido o PCR, bem como qualquer animal cujo diagnóstico tenha sido realizado recorrendo apenas aos testes rápidos, sem confirmação do mesmo por outros testes serológicos ou de PCR. Este critério foi principalmente motivado pela utilização do teste rápido de ELISA no CAMV em questão, teste este que apresenta uma menor concordância com os resultados obtidos por MAT.

Animais com suspeita ou confirmação de leptospirose que apresentassem comorbidades foram excluídos do estudo, bem como cães que não tenham sido submetidos a exame ecográfico ou cuja descrição das alterações verificadas neste exame não tenham sido registadas de forma completa e detalhada.

2.4. Procedimentos

2.4.1. Consulta

Durante a consulta foram colocadas questões para obtenção da história pregressa e do estímulo iatrotópico, bem como realizado um exame físico com o objetivo de detetar alterações clínicas nos cães.

2.4.2. Análises bioquímicas e hemograma

Foram realizadas análises bioquímicas e hemograma em todos os canídeos integrantes do estudo, sendo que a extensão das análises bioquímicas foi variável. Em alguns animais foram realizadas análises sanguíneas múltiplas vezes, no entanto, no nosso estudo apenas as primeiras análises foram utilizadas para efeitos estatísticos.

Nos casos de referência, as análises utilizadas são as realizadas no CAMV referente caso existam registos das mesmas e não tenham sido repetidas no HVA no dia de apresentação a consulta. Quando as análises foram realizadas no HVA, os parâmetros de hemograma foram avaliados com recurso ao analisador automático VetScan HM5 Hematology Analyzer e os parâmetros bioquímicos foram avaliados através do analisador automático Fujifilm DRI-CHEM NX500i.

2.4.3. Técnica ecográfica

Todos os animais foram sujeitos a um exame ecográfico completo utilizando o ecógrafo GE Logic P6 e uma sonda microconvexa com frequência de 4-10 MHz. Os exames não foram todos realizados pelo mesmo operador, existindo dois médicos veterinários responsáveis pela realização dos mesmos. No entanto, os exames seguiram um procedimento idêntico que incluiu a observação e avaliação de todos os órgãos abdominais e a descrição detalhada de todas as irregularidades encontradas.

As dimensões dos rins, dos linfonodos e do baço foram avaliadas de forma subjetiva. A ecogenicidade do córtex renal foi comparada com a ecogenicidade do baço, considerando-se hiperecogénico quando apresentava ecogenicidade igual ou superior à do parênquima esplénico. O mesmo foi considerado espessado quando exibia uma espessura superior à da medula. A existência de dilatação pélvica foi registada sempre que a pélvis renal apresentava uma altura superior a 3mm quando avaliada em plano transversal. Por sua vez, o fígado foi considerado hipoecogénico quando a parede dos vasos porta surgia mais proeminente na imagem contrastando com o parênquima menos ecogénico. A hepatomegalia verificou-se sempre que os lobos hepáticos apresentavam os bordos arredondados e quando este órgão se estendia desde a zona do estômago até ao rim direito, aumentando o contacto com o último.

2.5. Recolha de dados e análise estatística

A identificação dos animais e recolha dos dados de cada um foi conseguida com recurso ao *software* OranGest VET®, sendo a informação relativa a cada caso inserida numa base de dados do Microsoft Excel 2016. Os dados colhidos incluem: a idade, a raça, o sexo, o estado reprodutivo do animal, a data de apresentação, o estado de vacinação, o estilo de

vida (outdoor/indoor), as atividades praticadas pelos animais, o contacto com animais silvestres e/ou roedores, o acesso a fontes de água, dados relativos à anamnese e estímulos iatrotrópicos, os sinais clínicos exibidos em consulta, os resultados das análises laboratoriais (hemograma, análises bioquímicas, urianálise, rácio UPC e urocultura), resultados dos exames de diagnóstico específicos (ELISA e PCR), as alterações verificadas no exame ecográfico, a realização de radiografia torácica, o tratamento instituído, o recurso a diálise, o desenvolvimento de quadro pulmonar e/ou anúria/oligúria durante a hospitalização, a duração da hospitalização e o desfecho do caso clínico (alta médica, eutanásia ou morte natural e causa da morte, caso tenha ocorrido).

A análise dos dados foi realizada através de estatística descritiva e inferencial, utilizando-se o *software* SPSS-24.0 (*Statistical Package for the Social Sciences*). Para realização da análise descritiva foram utilizados diversos parâmetros para avaliar a distribuição das variáveis, nomeadamente a frequência, percentagem, média e desvio-padrão.

Para realização da análise inferencial, e tendo em consideração o cumprimento dos critérios necessários para a realização de testes paramétricos, nomeadamente o tamanho reduzido da amostra ($n=17$), foram utilizados testes não-paramétricos.

Para verificar a existência de associações entre as variáveis em estudo foi aplicado o teste do Qui-Quadrado (χ^2), teste este que serve para testar se dois ou mais grupos independentes diferem relativamente a uma determinada característica, isto é, se a frequência com que os elementos da amostra se repartem pelas classes de uma variável qualitativa é ou não aleatória. Foi também utilizada a significância do teste exato de Fisher quando sugerido pelo *software*. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando o *p-value* obtido era inferior a 0,05.

Para a apresentação dos dados recorreu-se ao uso de tabelas e gráficos, com os dados estatísticos antecidos de análise.

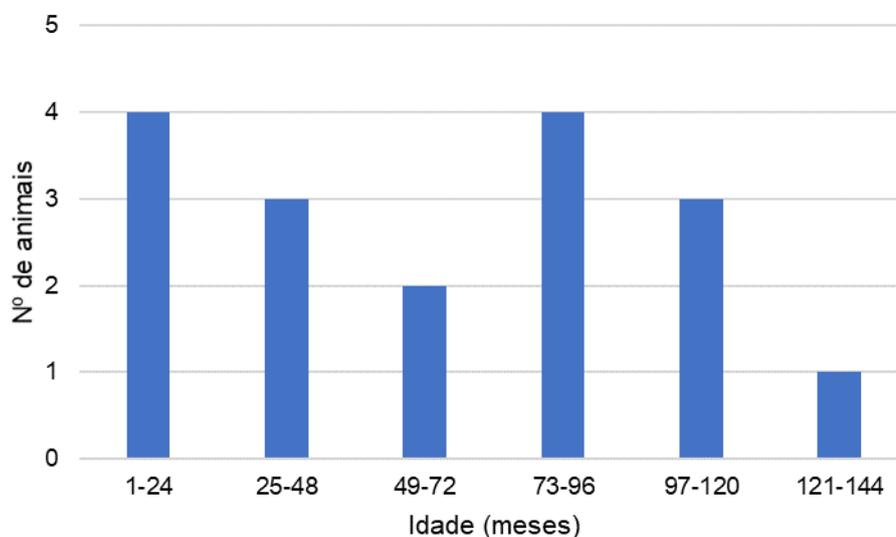
3. Resultados

3.1. Caracterização demográfica da amostra

A amostra estudada ($N=17$) era constituída por dez machos (58,8%) e sete fêmeas (41,2%), sendo uma delas esterilizada. Estes animais apresentavam uma idade média de $62,24 \pm 43,68$ meses, idades estas compreendidas entre os 3 meses e os 139 meses (aproximadamente 11 anos) (Gráfico 1).

No estudo foram incluídos canídeos sem raça definida (5/17), bem como animais de raça nomeadamente Basset Hound (1/17), Border Collie (1/17), Braco Alemão (1/17), Cão d'Água Português (1/17), Dálmata (1/17), Dogue Alemão (1/17), Dogue de Bordeaux (1/17), Epagneul Breton (1/17), Labrador (1/17), Pastor Alemão (2/17) e Pointer Inglês (1/17).

Gráfico 1 - Distribuição da idade dos animais



3.2. Estilo de vida da amostra

Quanto ao estilo de vida dos canídeos da amostra, oito dos animais tinham acesso ao exterior sem monitorização (47,1%), um tinha acesso monitorizado ao exterior (5,9%) e oito tinham acesso apenas a quintal (47,1%). Com base na história pregressa foi possível apurar que dez cães tinham contacto frequente com roedores (58,8%), três tinham contacto com animais silvestres através de atividades de caça (17,6%) e dois tinham acesso a fontes de água (11,8%).

3.3. Vacinação

Dos 17 animais presentes do estudo, apenas um se encontrava corretamente vacinado, embora a vacina administrada conferisse proteção apenas contra o serogrupo Canicola, serovariedade Portland-verre, e o serogrupo Icterohaemorrhagiae, serovariedade Copenhageni. Desta forma, 94,1% (n=16) dos canídeos integrados no estudo nunca tinham sido vacinados contra a leptospirose ou apresentavam a vacinação em atraso.

3.4. Testes de diagnóstico

Em relação aos testes de diagnóstico, dos 13 canídeos sujeitos ao teste sorológico de ELISA (76,5%) 12 revelaram titulações positivas (92,3%).

Por outro lado, dez animais realizaram PCR, sendo que 90% apresentaram um resultado positivo. As amostras analisadas incluíram o sangue (4/10), a urina (3/10) ou ambos (3/10).

É ainda importante realçar que seis animais incluídos do estudo realizaram os dois testes de diagnóstico em simultâneo.

3.5. Estímulos iatrotópicos e anamnese

Os motivos que mais frequentemente conduziram os detentores dos animais presentes no estudo a procurarem auxílio médico-veterinário ou sinais mencionados na anamnese incluem a letargia (n=14; 82,4%), a anorexia (n=12; 70,6%) e o vômito (n=9; 52,9%). De forma menos frequente, a diarreia (n=5; 29,4%), a polidipsia (n=3; 17,6%), a poliúria (n=2; 11,8%), e a perda de peso (n=2; 11,8%) foram mencionados como estímulos iatrotópicos ou como dados da anamnese.

3.6. Exame físico

As alterações de exame físico mais frequentemente encontradas incluem a desidratação, apresentada por mais de metade dos animais (n=9; 52,9%), e a dor abdominal (n=8; 47,1%). Por sua vez, alterações como a auscultação cardiopulmonar alterada, a hipotermia, a presença de mucosas hiperémicas ou ictéricas foram registadas em 17,6% (n=3) dos animais. A febre, a linfadenomegalia, a presença de petéquias e a taquicardia foram alterações exibidas por apenas 11,8% (n=2) dos animais do estudo (Tabela 3).

Tabela 3 - Alterações detetadas no exame físico

	Não		Sim	
	n	%	n	%
Desidratação	8	47,1	9	52,9
Dor abdominal	9	52,9	8	47,1
ACP alterada	14	82,4	3	17,6
Hipotermia	14	82,4	3	17,6
Mucosas hiperémicas	14	82,4	3	17,6
Mucosas ictéricas	14	82,4	3	17,6
Febre	15	88,2	2	11,8
Linfadenomegalia	15	88,2	2	11,8
Petéquias	15	88,2	2	11,8
Taquicardia	15	88,2	2	11,8
Dispneia	16	94,1	1	5,9
Taquipneia	16	94,1	1	5,9
Hipertensão	16	94,1	1	5,9

Legenda: ACP – Auscultação cardiopulmonar

3.7. Análises bioquímicas

Todos os animais participantes no nosso estudo foram sujeitos a análises bioquímicas de extensão variável. Os resultados das mesmas encontram-se descritos na Tabela 4.

Tabela 4 - Alterações detetadas nas análises bioquímicas

	Não fez		Diminuída		Normal		Aumentada		Total	
	n	n	%	n	%	n	%	n	%	
Ureia	—	—	—	—	—	—	17	100	17	100,0
Creatinina	—	—	—	—	—	—	17	100,0	17	100,0
ALT	—	—	—	8	47,1	9	52,9	17	100,0	
FAS	—	—	—	3	17,6	14	82,4	17	100,0	
Cl	3	7	50,0	7	50,0	—	—	14	100,0	
K	3	4	28,6	8	57,1	2	14,3	14	100,0	
Na	3	11	78,6	3	21,4	—	—	14	100,0	
PT	15	—	—	1	50,0	1	50,0	2	100,0	
Albumina	5	—	—	11	91,7	1	8,3	12	100,0	
Bilirrubina	12	—	—	1	20,0	4	80,0	5	100,0	
Fósforo	14	—	—	1	33,3	2	66,7	3	100,0	
Glucose	5	1	8,3	5	41,7	6	50,0	12	100,0	

3.8. Hemograma

Todos os animais que integram o estudo foram sujeitos a hemograma, cujos resultados se encontram descritos de forma mais detalhada na Tabela 5. As alterações mais frequentemente encontradas incluem a presença de leucocitose (n=11; 65%), de neutrofilia (n=10; 59%), de trombocitopenia (n=10; 59%) e de anemia (n=5; 29%).

Tabela 5 - Alterações detetadas no hemograma

	Não		Sim	
	n	%	n	%
Leucocitose	6	35	11	65
Leucopenia	17	100	—	—
Linfocitose	15	88	2	12
Linfopenia	16	94	1	6
Monocitose	15	88	2	12
Monocitopenia	17	100	—	—
Neutrofilia	7	41	10	59
Neutropenia	17	100	—	—
Anemia	12	71	5	29
Eritrocitose	17	100	—	—
Trombocitopenia	7	41	10	59
Trombocitose	16	94	1	6

3.9. Relação entre existência de trombocitopenia e o desfecho do caso clínico

Da associação entre a trombocitopenia e a existência de alta médica apenas metade dos casos que apresentavam trombocitopenia resultaram em óbito (n=5; 50%); contudo, não existe uma associação significativa (p=1,000), o que sugere uma relação de independência entre as duas variáveis (Tabela 6).

Tabela 6 - Relação entre a trombocitopenia e o desfecho clínico

		Trombocitopenia			Total	
		Não	Sim			
Alta médica	Não	n	4	5	9	
		% Alta médica	44,4%	55,6%	100%	
		% Trombocitopenia	57,1%	50,0%	52,9%	
	Sim	n	3	5	8	
		% Alta médica	37,5%	62,5%	100%	
		% Trombocitopenia	42,9%	50,0%	47,1%	
Total	n	7	10	17		
	% Alta médica	41,2%	58,8%	100%		
	% Trombocitopenia	100%	100%	100%	1,000	
(p=Teste de Fisher)						

3.10. Urinálise

Apenas quatro dos 17 canídeos presentes no estudo realizaram urinálise, sendo que todos exibiam proteinúria (4/4), 75% apresentavam hematúria (3/4) e metade piúria (2/4).

3.11. Alterações ecográficas

Todos os animais do estudo foram sujeitos a um exame ecográfico completo, sendo dado um maior destaque à ecografia renal e hepática uma vez que estes são os órgãos mais frequentemente afetados aquando de uma infeção por *Leptospira* spp..

3.11.1. Ecografia renal

No exame ecográfico foram detetadas alterações renais em 13 dos 17 animais incluídos no estudo (76,5%). Estas alterações incluíram o aumento da ecogeneidade do córtex renal (n=10; 58,8%) e renomegalia (n=8; 47,1%). As restantes alterações observadas encontram-se descritas na Tabela 7.

Tabela 7 - Alterações detetadas na ecografia renal

Ecografia Renal (Alterações)						
	Não		Sim		Total	
	n	%	n	%	n	%
Aumento da ecogenicidade do córtex	7	41,2	10	58,8	17	100,0
Renomegalia	9	52,9	8	47,1	17	100,0
Líquido perirenal	13	76,5	4	23,5	17	100,0
Medullary Rim Sign	15	88,2	2	11,8	17	100,0
Líquido subcapsular	15	88,2	2	11,8	17	100,0
Pielectasia	16	94,1	1	5,9	17	100,0
Perda de diferenciação corticomedular	17	100,0	—	—	17	100,0
Hiperecogenicidade difusa	17	100,0	—	—	17	100,0
Calcificação da medula renal	17	100,0	—	—	17	100,0

3.11.2. Ecografia hepática

A ecografia hepática estava alterada em 11 dos 17 animais estudados (64,7%) (Tabela 8).

Tabela 8 - Alterações detetadas na ecografia hepática

Ecografia Hepática (Alterada)		
	n	%
Não	6	35,3
Sim	11	64,7
Ecografia Hepática (Alterações)		
Hepatomegalia		
Não	9	52,9
Sim	8	47,1
Hiperecogenicidade		
Não	17	100,0
Hipoecogenicidade		
Não	13	76,5
Sim	4	23,5

3.11.3. Restante exame ecográfico

Relativamente ao restante exame ecográfico, foram detetadas alterações em nove animais, verificando-se que a vesícula biliar era o órgão mais frequentemente afetado (n=7; 41,2%) (Tabela 9). Os achados ecográficos da vesícula biliar descritos neste estudo incluem

a presença de lamas biliares (4/17), o espessamento da parede (3/17), a hiperecogenicidade da parede (1/17) e o edema da parede (1/17).

Tabela 9 - Alterações detetadas no restante exame ecográfico

	n	%
Vesícula Biliar		
Não	10	58,8
Sim	7	41,2
Linfonodos		
Não	14	82,4
Sim	3	17,6
Baço alterado		
Não	15	88,2
Sim	2	11,8
Estômago		
Não	16	94,1
Sim	1	5,9
Líquido Livre		
Não	16	94,1
Sim	1	5,9
Peritonite		
Não	16	94,1
Sim	1	5,9
Total	17	100

3.12. Relação entre a concentração de ureia e creatinina e alterações na ecografia renal

Uma vez que todos os animais, independentemente de exibirem alterações na ecografia renal, apresentaram concentrações aumentadas de ureia e creatinina é impossível inferir a existência de associação entre as duas variáveis.

3.13. Relação entre a concentração de FAS e ALT e alterações na ecografia hepática

Da associação entre a concentração de FAS e a existência de alterações no exame ecográfico do fígado verificou-se que não existe associação significativa entre as duas variáveis ($p=1,000$) (Tabela 10).

Da mesma forma, não foi encontrada associação significativa entre a concentração de ALT e a presença de alterações na ecografia hepática ($p=0,620$) (Tabela 11).

Tabela 10 - Relação entre a concentração de FAS e a ecografia hepática

			Eco Hepática Alterada			<i>p</i>
			Não	Sim	Total	
FAS	Normal	n	1	2	3	
		% FAS	33,3%	66,7%	100%	
		% EcoHepAlt.	16,7%	18,2%	17,6%	
	Aumentada	n	5	9	14	
		% FAS	35,7%	64,3%	100%	
		% EcoHepAlt.	83,3%	81,8%	82,4%	
Total	n	6	11	17	1,000	
	% FAS	35,3%	64,7%	100%		
	% EcoHepAlt.	100%	100%	100%		

(p=Teste de Fisher)

Tabela 11 - Relação entre a concentração de ALT e a ecografia hepática

			Eco Hepática Alterada			<i>p</i>
			Não	Sim	Total	
ALT	Normal	n	2	6	8	
		% ALT	25,0%	75,0%	100%	
		% EcoHepAlt.	33,3%	54,5%	47,1%	
	Aumentada	n	4	5	9	
		% ALT	44,4%	55,6%	100%	
		% EcoHepAlt.	66,7%	45,5%	52,9%	
Total	n	6	11	17	0,620	
	% ALT	35,3%	64,7%	100%		
	% EcoHepAlt.	100%	100%	100%		

(p=Teste de Fisher)

3.14. Relação entre a existência de alterações na ecografia renal e desfecho do caso clínico

Da associação entre a existência de alterações na ecografia renal e a morte dos animais é possível inferir que dos casos que apresentaram a ecografia renal alterada (n=13; 76,5%) a maioria não teve alta médica (n=8; 61,5%); contudo, não foi encontrada uma associação significativa (p=0,294) no nosso estudo, o que sugere uma relação de independência entre as duas variáveis (Tabela 12).

Tabela 12 - Relação entre a ecografia renal e o desfecho clínico

		Eco Renal Alterada		Total	
		Não	Sim		
Alta médica	Não	n	1	8	9
		% Alta médica	11,1%	88,9%	100%
		% Eco Renal Alt.	25,0%	61,5%	52,9%
	Sim	n	3	5	8
		% Alta médica	37,5%	62,5%	100%
		% Eco Renal Alt.	75,0%	38,5%	47,1%
Total	n	4	13	17	
	% Alta médica	23,5%	76,5%	100%	
	% Eco Renal Alt.	100%	100%	100%	0,294

(p=Teste de Fisher)

3.15. Relação entre a existência de alterações na ecografia hepática e desfecho do caso clínico

Da associação entre a presença de alterações na ecografia hepática e a alta médica é possível observar que dos casos que apresentaram alterações no exame ecográfico deste órgão (n=11; 64,7%) a maioria não sobreviveu (n=6; 54,5%); contudo, não existe uma associação significativa (p=1,000), o que sugere uma relação de independência entre as duas variáveis (Tabela 13).

Tabela 13 - Relação entre a ecografia hepática e desfecho clínico

		Eco Hepática Alterada		Total	p
		Não	Sim		
Alta médica	Não	n	3	6	9
		% Alta médica	33,3%	66,7%	100%
		% Eco Hep. Alt.	50,0%	54,5%	52,9%
	Sim	n	3	5	8
		% Alta médica	37,5%	62,5%	100%
		% Eco Hep. Alt.	50,0%	45,5%	47,1%
Total	n	6	11	17	
	% Alta médica	35,3%	64,7%	100%	
	% Eco Hep. Alt.	100%	100%	100%	1,000

(p=Teste de Fisher)

3.16. Diálise

O recurso a este tratamento só aconteceu em dois casos do nosso estudo, casos esses que se apresentavam refratários aos protocolos instituídos com o objetivo de eliminar a azotemia. Destes animais, um sobreviveu e outro morreu, tendo completado apenas uma sessão de diálise antes da morte.

3.17. Radiografia torácica e hemorragia pulmonar

Dos 17 animais estudados, apenas sete realizaram radiografia torácica no decorrer da hospitalização e destes, 6 apresentaram alterações radiográficas compatíveis com a existência de hemorragia pulmonar.

3.18. Desenvolvimento de quadro pulmonar e quadro anúrico/oligúrico durante a hospitalização

Os resultados do estudo indicam que oito animais desenvolveram um quadro pulmonar durante a hospitalização (47,1%), considerando-se para este efeito os animais que apresentaram alterações na radiografia torácica, alterações na auscultação cardiopulmonar e/ou dispneia.

Por outro lado, apenas um cão desenvolveu um quadro anúrico/oligúrico durante o período de hospitalização (5,9%).

3.19. Relação entre o desenvolvimento de quadro pulmonar e o desfecho do caso clínico

O estudo procurou verificar a existência de relação entre o desenvolvimento de quadro pulmonar durante a hospitalização com a morte dos animais, no entanto não foram encontradas evidências significativas de que estas variáveis sejam dependentes ($p=0,637$) (Tabela 14).

Tabela 14 - Relação entre o desenvolvimento de quadro pulmonar e o desfecho clínico

		Alta Médica			<i>p</i>
		Não	Sim	Total	
Desenv. quadro pulmonar	Não	n	4	5	9
		% Desenv Quad Pulm	44,4%	55,6%	100%
		% Alta Médica	44,4%	62,5%	52,9%
	Sim	n	5	3	8
		% Desenv Quad Pulm	62,5%	37,5%	100%
		% Alta Médica	55,6%	37,5%	47,1%
Total	n	9	8	17	
	% Desenv Quad Pulm	52,9%	47,1%	100%	
	% Alta Médica	100%	100%	100%	

(p =Teste de Fisher)

3.20. Relação entre o desenvolvimento de quadro anúrico/oligúrico e o desfecho do caso clínico

Outro dos objetivos do estudo passava pelo apuramento de uma possível relação entre o desenvolvimento de um quadro de anúria ou oligúria durante a hospitalização e a morte dos animais, tendo-se verificado que a associação das duas variáveis não foi significativa ($p=1,000$) (Tabela 15).

Tabela 15 - Relação entre o desenvolvimento de quadro anúrica/oligúrico e o desfecho clínico

		Alta Médica			<i>p</i>
		Não	Sim	Total	
Desenv. quadro anúrico	Não	n	8	8	16
		% Desenv Quad Anúric	50,0%	50,0%	100%
oligoanúrico		% Alta Médica	88,9%	100,0%	94,1%
	Sim	n	1	0	1
		% Desenv Quad Anúric	100,0%	0,0%	100%
		% Alta Médica	11,1%	0,0%	5,9%
Total		n	9	8	17
		% Desenv Quad Anúric	52,9%	47,1%	100%
		% Alta Médica	100%	100%	100%

(p =Teste de Fisher)

3.21. Alta médica e causa da morte

Apenas oito animais tiveram alta médica, isto é, 52,9% dos animais morreram no decurso da infeção por *Leptospira* spp.. A principal causa que potenciou a morte dos animais foi o desenvolvimento de hemorragia pulmonar (55,6%). Três cães foram sujeitos a eutanásia.

4. Discussão

Os objetivos do nosso estudo centraram-se na caracterização de uma amostra de canídeos infetados com *Leptospira* spp., bem como na análise de possíveis relações entre as alterações hematológicas, achados ecográficos e desfecho clínico dos casos.

Devido ao carácter retrospectivo do estudo, nem todas as variáveis em análise foram avaliadas em todos os animais, o que pode comprometer a veracidade da frequência com que algumas alterações foram detetadas. Por outro lado, tendo em conta que o nosso estudo apenas integra animais infetados, não contemplando nenhum grupo controlo, não foi possível determinar se variáveis como a idade, o sexo, a raça, o estilo de vida e atividades desenvolvidas pelos animais podem ser consideradas fatores predisponentes para a infeção.

Uma vez que apenas quatro animais em 17 apresentavam idades inferiores a um ano, os resultados obtidos em relação a esta variável estão de acordo com as conclusões de diversos estudos que afirmam que o risco de infeção em animais com idades inferiores a um

ano é menor (Ward et al. 2002; Grayzele and DeBess 2016; Delaude et al. 2017; López et al. 2019). Além disto, a maioria dos animais estudados apresentou idades compreendidas entre os quatro e os dez anos de idade, o que é compatível com os resultados obtidos por Ward et al. (2002).

Em relação ao sexo, no estudo desenvolvido, 58,8% dos animais infetados eram machos o que se coaduna com os resultados obtidos em diversos estudos (Kikuti et al. 2012; López et al. 2019; Smith et al. 2019).

Em relação ao estilo de vida dos animais incluídos no estudo, oito dos animais tinham apenas acesso a um quintal, não sendo eliminada a hipótese de existir a passagem de roedores nos mesmos, o que pode ter contribuído para a infeção destes animais. Por outro lado, dos animais com acesso ao exterior, apenas um era monitorizado atentamente pelo tutor, sendo passeado à trela, enquanto os restantes oito cães do estudo tinham acesso não monitorizado ao exterior.

Tendo em conta que a maioria dos animais estudados se encontra num ambiente rural ou misto, qualquer um destes estilos de vida permite o contacto com roedores, sendo que o acesso ao exterior sem monitorização é, teoricamente, o estilo de vida que oferece maiores riscos.

O contacto com roedores é considerado o principal fator de risco associado à leptospirose, verificando-se neste estudo que a maioria dos animais mantinha contacto frequente com os mesmos, o que está de acordo com o estudo de Cárdenas et al. (2018). No entanto, o contacto com animais silvestres, bem como com fontes de água são outros fatores de risco associados ao desenvolvimento desta infeção e que se registaram, respetivamente, em dois e três dos animais estudados.

Relativamente ao estado vacinal dos animais, o resultado esperado seria a ausência de vacinação em todos os animais, no entanto, um dos animais incluídos no estudo encontrava-se vacinado com uma vacina cuja proteção abrange apenas o serogrupo Canicola e o serogrupo Icterohaemorrhagiae, podendo estar infetado por outro serogrupo. Deste modo, como a vacinação induz uma resposta imunitária semelhante à existente aquando de uma infeção natural, a exposição à bactéria foi confirmada por PCR, o que permitiu a inclusão do animal no nosso estudo.

Apesar de ser considerado o *gold standard*, o MAT não foi utilizado como meio de diagnóstico sorológico no nosso estudo. As razões que determinam esta escolha não são conhecidas, no entanto, podem estar relacionadas com o custo mais elevado deste método de diagnóstico e ainda pelo facto de ser um teste mais moroso que os restantes. Desta forma, os meios de diagnóstico utilizados neste estudo incluem o teste sorológico de ELISA e o PCR, tendo-se verificando seroconversão em 92,3% dos animais diagnosticados por ELISA e 90%

de resultados positivos de PCR.

É importante realçar a obtenção de um resultado falso-negativo através do teste de ELISA, tendo sido confirmada posteriormente a infeção por *Leptospira* spp. através da realização de PCR. A ausência de seroconversão foi, provavelmente, o que motivou este resultado, sendo importante mencionar que a sensibilidade deste teste oscila entre os 48 a 100% (Effler et al. 2002; Kucerova et al. 2011; Niloofa et al. 2015).

Apesar de apresentar uma sensibilidade maior, verificou-se a presença de um falso-negativo nos resultados obtidos por PCR, tendo sido realizado um teste de ELISA de forma a confirmar a infeção (Riediger et al. 2017). Neste caso, a amostra utilizada para realização do PCR foi sangue, o que pode motivar a obtenção de um falso-negativo caso o animal já não se encontre na fase de bacteriemia. Desta forma, é possível realçar a importância da realização de PCR simultaneamente no sangue e urina, o que aconteceu em apenas três dos animais estudados.

Os dados colhidos relativamente à anamnese e aos estímulos que motivaram a procura de assistência médico-veterinária revelam que a letargia, a anorexia e o vômito apresentaram um maior destaque, resultados estes semelhantes aos obtidos em diversos estudos (Geisen et al. 2007; Mastroilli et al. 2007; Tangeman and Littman 2013; Knöpfler et al. 2017; Sonet et al. 2017). Por outro lado, no nosso estudo as alterações mais frequentemente detetadas no exame físico incluem a desidratação e a dor abdominal, sinais estes que no estudo desenvolvido por Geisen et al. (2007) surgem em apenas 31% e 19% dos casos, respetivamente. Segundo Geisen et al. (2007), a alteração mais frequentemente encontrada no exame físico de animais com leptospirose é a presença de icterícia, alteração esta que surgiu apenas em 17,6% dos animais da presente amostra analisada. Uma vez que ambos os estudos apresentam aproximadamente o mesmo número de animais com sinais de lesão hepática e que na leptospirose canina a icterícia correlaciona-se positivamente com a gravidade da necrose hepática, podemos sugerir que os animais estudados por Geisen et al. (2007) apresentavam lesões hepáticas mais graves e que, provavelmente, existiu uma maior precocidade na procura de auxílio por parte dos detentores dos animais do nosso estudo, o que determinou uma menor progressão dos sinais clínicos encontrados.

A leptospirose canina pode manifestar-se de forma aguda, subaguda e crónica (Greene et al. 2012; Sykes 2014). A forma aguda instala-se rapidamente e conduz à morte dos animais ainda antes do desenvolvimento de sinais de lesão renal e/ou hepática. Por outro lado, a forma subaguda pressupõe uma progressão mais lenta da infeção, com a deteção de sinais relacionados com a insuficiência renal e/ou hepática. Tendo em conta as alterações mais frequentemente encontradas no nosso estudo, e cruzando essa informação com a clas-

sificação do tipo de infecção sugerida por Greene et al. (2012) e Sykes (2014), é possível afirmar que todos os animais incluídos neste estudo apresentavam uma infecção subaguda por *Leptospira* spp. Este resultado é diferente do descrito por Mastrorilli et al. (2007) em que dos 16 animais estudados, apenas um apresentava infecção subaguda. No entanto, o critério utilizado para considerar uma infecção como sendo subaguda pressupunha a presença de polidipsia e poliúria num período de dez dias antes do surgimento de mais sinais clínicos. É importante referir que o facto de todos os casos do nosso estudo serem considerados infecções subagudas pode ser um resultado sobrestimado, uma vez que devido à velocidade de progressão dos casos de infecção aguda estes animais morrem frequentemente antes do diagnóstico definitivo de leptospirose e antes de realizarem todos os exames incluídos nos critérios de inclusão do estudo.

Segundo Reagan e Sykes (2019), a azotemia ocorre em 80 a 100% dos animais infectados, o que se verificou no nosso estudo. Os mesmos autores afirmam que apenas 50% dos casos apresentam um aumento das enzimas hepáticas, no entanto, no nosso estudo, 82,4% dos animais mostraram concentrações de FAS elevadas e 52,9% tinham a concentração de ALT aumentada, o que está de acordo com os resultados de Geisen et al. (2007) e de Tangeman e Littman (2013).

É importante salientar que todos os casos estudados mostraram envolvimento renal na infecção, mas nem todos apresentavam aumento das enzimas hepáticas, sendo que três animais exibiam apenas alterações nas análises bioquímicas renais. Os resultados mencionados diferem dos obtidos por Tangeman e Littman (2013) em que metade dos animais apresentavam apenas aumento da ureia e da creatinina, ao contrário dos 17,6% verificados neste estudo.

Neste estudo não foi encontrado nenhum animal que apenas mostrasse alterações nas enzimas hepáticas como demonstrado por McCallum et al. (2018). Estes resultados podem ser explicados pela maior testagem de infecção em animais que exibam a apresentação típica de leptospirose, isto é, azotemia e aumento das transaminases, do que em animais que apresentassem apenas o aumento das enzimas hepáticas.

Em relação ao ionograma, segundo Greene et al. (2012), as alterações mais frequentemente encontradas incluem a hiponatremia, hipocloremia e a hipocalemia, verificando-se no nosso estudo que apenas três animais apresentavam concomitantemente uma concentração baixa destes iões. Os resultados obtidos para cada ião foram concordantes com o esperado.

Por sua vez, a concentração de albumina apresentou-se normal na quase totalidade dos animais em que foi avaliado este parâmetro, sendo que o resultado esperado era a presença de hipoalbuminemia. No entanto, é de realçar que a maioria dos animais estudados estavam desidratados no momento da análise, o que pode significar que a concentração de

albumina verificada pode não ser real (Tangeman and Littman 2013).

É importante referir que a concentração de bilirrubina só era analisada nos animais que apresentavam icterícia ou um aumento bastante expressivo das enzimas hepáticas. Desta forma, é possível justificar o número diminuto de animais que foram sujeitos a esta análise e o facto de quatro em cinco destes animais apresentar hiperbilirrubinémia.

Segundo Reagan e Sykes (2019), a trombocitopenia está presente em 20 a 50% dos animais infetados. No nosso estudo, mais de metade dos animais exibiu esta alteração no hemograma, estando de acordo com os resultados obtidos por vários autores (Geisen et al. 2007; Mastroilli et al. 2007; Tangeman and Littman 2013; Barthélemy et al. 2017; Knöpfler et al. 2017).

Um dos objetivos do nosso estudo passou por avaliar se a trombocitopenia estava associada a uma maior mortalidade, tal como sugerido por Carr et al. (2002). Os resultados obtidos indicam que metade dos animais que apresentavam uma contagem de plaquetas inferior ao esperado não sobreviveram, no entanto, esta associação não foi significativa. Este resultado pode ser explicado pela dimensão reduzida da amostra e ainda pelo facto da contagem de plaquetas aqui analisada ter sido realizada numa fase precoce da infeção.

É ainda importante referir que a deteção de trombocitopenia no hemograma não foi confirmada por esfregaço em nenhum dos casos, o que pode conduzir a uma sobrestimação dos resultados do nosso estudo, uma vez que alguns dos casos de agregação plaquetária podem ter sido contabilizados como casos de trombocitopenia.

Por outro lado, apenas 29% dos animais estudados apresentavam anemia, valor este que se afasta dos resultados obtidos pela maioria dos estudos (37,5-86%) (Geisen et al. 2007; Mastroilli et al. 2007; Barthélemy et al. 2017). A percentagem diminuta de animais com anemia obtida neste estudo pode ser explicada pelo facto do hemograma ter sido realizado no dia de apresentação à consulta, momento este em que nenhum dos animais incluídos mostrava sinais de anúria/oligúria, de doença renal crónica ou de perda de sangue. É altamente provável que, no decorrer da hospitalização e com o desenvolvimento de novos quadros, nomeadamente de hemorragia pulmonar, que os hemogramas realizados nesse período apresentassem sinais de anemia com maior frequência.

No nosso estudo, 65% dos animais apresentam leucocitose e 59% neutrofilia, sendo estas as alterações mais encontradas nos estudos desenvolvidos por Geisen et al. (2007), Mastroilli et al. (2007) e Knöpfler et al. (2017). Nos estudos de Greene et al. (2012) e de Reagan and Sykes (2019), as alterações mais frequentemente encontradas incluem a leucopenia e, mais tarde, a leucocitose com desvio à esquerda e a linfopenia.

Uma vez que apenas quatro animais da amostra foram sujeitos a urianálise, não podem ser feitas ilações significativas sobre os resultados. No entanto, é importante referir que

o facto de todas as amostras de urina analisadas exibirem sinais de proteinúria é compatível com a lesão dos túbulos renais descrita em casos de leptospirose (Greene et al. 2012; Sykes 2014).

Em relação à componente imagiológica do estudo, nenhum animal apresentou um exame ecográfico normal, sendo que 76,5% dos animais apresentaram alterações renais; 64,7% exibiam alterações hepáticas; e 47,1% alterações em ambos os órgãos. É importante mencionar que existe uma discrepância evidente entre as alterações detetadas por diferentes autores, inclusivamente no que diz respeito aos órgãos mais afetados. Por exemplo, os resultados obtidos por Knöpfler et al. (2017) revelam uma maior frequência de alterações hepáticas e/ou da vesícula biliar enquanto os estudos realizados por Tangeman e Littman (2013) e Sonet et al. (2017) apontam que o órgão que mais frequentemente exhibe alterações devido à leptospirose é o rim. Estas discrepâncias podem ser justificadas pelo possível diferente tropismo de alguns serogrupos para diferentes órgãos; pelos diferentes desenhos de estudo, sendo que alguns apresentam um carácter prospetivo e outros retrospectivo; e ainda devido aos diferentes operadores e diferentes ecógrafos utilizados nos estudos.

As alterações encontradas no nosso estudo estão de acordo com a descrição de Reagan e Sykes (2019), bem como com os resultados obtidos por Forrest et al. (1998) e Tangeman e Littman (2013). Por outro lado, ao compararmos os resultados do nosso estudo com um estudo mais recente, podemos verificar que as alterações mais frequentemente encontradas, isto é, o aumento da ecogenicidade do córtex renal e a renomegalia, apresentam uma frequência ainda mais elevada no estudo de Sonet et al. (2017) (100% e 60%, respetivamente). No entanto, além dos achados ecográficos previamente mencionados, Sonet et al. (2017) detetaram ainda, com elevada frequência, o aumento da ecogenicidade da medula, a perda de diferenciação corticomedular e o espessamento do córtex renal. O facto de no estudo desenvolvido não terem sido encontradas estas alterações, que surgem de forma tão expressiva nos resultados de Sonet et al. (2017), pode ser justificado pela natureza retrospectiva do nosso estudo, o que pode conduzir a uma descrição menos detalhada dos achados ecográficos; e ainda pelo desenho de estudo de Sonet et al. (2017) que previa a observação das imagens pelo mesmo operador em dois momentos diferentes, o que determina uma análise mais profunda das mesmas.

A acumulação de líquido perirenal foi descrita por Holloway e O'Brien (2007) como uma alteração que surge associada à insuficiência renal aguda e justificada pelo extravasamento de fluidos dos túbulos renais para o interstício, o que conduz à sobrecarga da drenagem linfática e, conseqüentemente, à acumulação de líquido perto dos rins. A administração de fluidos por via intravenosa pode ser um fator que potencia uma acumulação de líquido mais extensa, no entanto, no nosso estudo não temos informação de quantos animais realizaram

a ecografia antes ou após a instituição de fluidoterapia, não sendo possível determinar se esta influenciou os resultados obtidos em relação a esta alteração ecográfica.

Um dos objetivos do estudo passou por determinar se existia alguma relação entre a presença de alterações na ecografia renal com o desfecho dos casos clínicos, relação esta que revelou não ter relevância estatística. Este resultado pode ser justificado pelo facto das imagens renais obtidas por ecografia não apresentarem uma correlação direta com a extensão e gravidade da doença clínica (Syme and Jepson 2017). Por outro lado, no teste estatístico realizado não foram especificadas quais as alterações presentes nem a gravidade das mesmas. Desta forma, o resultado poderia ter sido diferente caso tivesse sido atribuído um *score* às diferentes alterações e, dentro das mesmas, diferentes níveis de gravidade.

Outro objetivo do estudo era determinar se existia uma relação entre as concentrações de creatinina e ureia com a presença de uma ecografia renal alterada, no entanto, tendo em conta que todos os animais apresentavam estes parâmetros bioquímicos aumentados, não foi possível encontrar uma associação entre as duas variáveis. Uma forma de contornar este problema passava pela organização dos valores de concentração de ureia e creatinina segundo uma escala de gravidade e, desta forma, verificar se valores mais elevados destes parâmetros apresentam alguma relação com alterações mais ou menos extensas no exame ecográfico.

Quanto à ecografia hepática, segundo Reagan e Sykes (2019), os achados mais frequentes incluem a hipocogenicidade do parênquima e a hepatomegalia, o que está de acordo com os resultados obtidos neste estudo e noutros (Tangeman and Littman 2013; Knöpfler et al. 2017; Sonet et al. 2017).

Semelhantemente ao realizado com a ecografia renal, procurou-se a existência de uma associação entre a presença de alterações imagiológicas do fígado e a morte dos animais, no entanto, as duas variáveis são independentes. Mais uma vez, a atribuição de um *score* aos diferentes achados ecográficos e à gravidade dos mesmos podia conduzir à obtenção de um resultado diferente.

A possível relação entre a concentração das enzimas hepáticas e a presença de alterações na ecografia deste órgão foi também avaliada, concluindo-se que estas variáveis não apresentaram uma associação significativa. É importante realçar que o aumento das enzimas hepáticas ocorre com maior frequência do que a ocorrência de doença e lesão hepática uma vez que outras causas externas ao fígado, como por exemplo infeções sistémicas ou alterações gastrointestinais, podem induzir um aumento da concentração destas enzimas, o que pode justificar os resultados obtidos (Cocker and Richter 2017). Não obstante, uma nova análise que contemple diferentes níveis de aumento da concentração de ALT e FAS, bem como diferentes graus de alterações (ecogenicidade e ecotextura do parênquima) observadas nas

imagens ecográficas do fígado, pode conduzir a um resultado diferente do obtido.

A presença de alterações no exame ecográfico da vesícula biliar é algo apontado por diversos autores, sendo o órgão mais afetado no nosso estudo (41,2%) além dos rins e do fígado (Tangeman and Littman 2013; Knöpfler et al. 2017; Sonet et al. 2017; McCallum et al. 2018). É importante referir que, embora seja destacado por Sonet et al. (2017) como um possível sinal de leptospirose canina, nenhum dos casos estudados apresentava mucocelo biliar. As causas que conduzem ao envolvimento da vesícula biliar são ainda desconhecidas, no entanto, a vasculite e a resposta inflamatória gerada pela infeção com esta bactéria têm sido apontadas como causas potenciais (Davies and Aoyagi 2017).

É relevante mencionar que é impossível determinar se as alterações encontradas no exame ecográfico estavam relacionadas com a infeção por leptospirose ou se eram pré-existentes, o que pode conduzir a alguns resultados sobrestimados.

A diálise é um procedimento cuja utilização leva a uma diminuição acentuada na mortalidade dos animais que apresentem azotemia grave nos casos de leptospirose (Adin and Cowgill 2000). O facto de apenas dois animais terem sido submetidos a diálise, sendo que mais animais apresentavam os critérios necessários para tal, pode ser justificado pelo preço elevado das sessões de diálise e ainda pelo facto das mesmas não serem realizadas no CAMV em que o estudo ocorreu, sendo necessária referencia para outra estrutura hospitalar.

Durante a hospitalização, apenas um animal desenvolveu quadro de oligúria. No primeiro dia de internamento este canídeo apresentava concentrações de ureia e creatinina elevadas, bem como hipercalemia e hiperfosfatemia, alterações estas compatíveis com o quadro desenvolvido (Greene et al. 2012). A diálise seria o tratamento de eleição para este animal, no entanto por motivos financeiros, apenas foi instituído um protocolo médico de hidratação e administração de diuréticos, com subsequente morte do animal.

Nos casos de oligúria/anúria é comum o desenvolvimento de complicações associadas à azotemia e à hiperhidratação (Adin and Cowgill 2000). Desta forma, o nosso estudo procurou encontrar uma associação entre o desenvolvimento destes quadros de produção de urina diminuída com o desfecho clínico dos casos. Os resultados obtidos revelam que não existiu uma associação significativa entre os dados, no entanto é pertinente mencionar que a percentagem de animais oligúricos/anúricos no nosso estudo é bastante inferior ao que é habitualmente apontado noutros estudos, provavelmente devido ao tamanho reduzido da amostra (Adin and Cowgill 2000; Mastroilli et al. 2007; Kohn et al. 2010; Sonet et al. 2017). Desta forma, o número de casos que desenvolveram este quadro parece subestimado, podendo ser interessante procurar esta associação em próximos estudos que apresentem uma amostra de maior dimensão.

No nosso estudo, oito animais (47,1%) apresentaram alterações que evidenciam o envolvimento pulmonar no quadro de infeção e que incluíam alterações na auscultação cardiopulmonar, a presença de dificuldades respiratórias e/ou alterações radiográficas nos pulmões. É importante referir que apenas sete animais realizaram radiografias torácicas, o que pode determinar que os achados apresentados estejam subestimados, uma vez que os animais poderiam apresentar alterações no exame radiográfico que não fossem detetáveis através do exame físico e que, desta forma, não foram contabilizadas. Este último facto pode justificar as diferenças encontradas no que diz respeito ao envolvimento pulmonar na leptospirose entre o estudo desenvolvido e outros estudos, cuja realização de radiografias torácicas foi sistemática e cujos resultados foram de 57 (Kohn et al. 2010) e 70% (Knöpfler et al. 2017).

Os estudos realizados por Kohn et al. (2010) e Knöpfler et al. (2017) indicam que o envolvimento pulmonar em casos de leptospirose conduz a uma maior mortalidade, sendo considerado um fator de mau prognóstico. Desta forma, o nosso estudo procurou verificar a existência de uma relação entre estas duas variáveis, no entanto os resultados não foram significativos. A ausência de relação pode ser justificada pela dimensão reduzida da amostra e ainda pelo facto de nem todos os animais terem sido sujeitos a radiografia torácica.

Dos 17 animais estudados, 52,9% não sobreviveram, o que está em concordância com os resultados relativamente à mortalidade obtidos noutros estudos (Carr et al. 2002; Miller et al. 2007). Apesar do referido anteriormente, vários estudos apresentam taxas de mortalidade associada à leptospirose mais baixas, com valores próximos de 30% (Birnbaum et al. 1998; Geisen et al. 2007; Mastroilli et al. 2007; Kohn et al. 2010; Major et al. 2014; Knöpfler et al. 2017; Barthélemy et al. 2017). É, no entanto, pertinente referir que a maioria dos animais analisados nos estudos anteriores apresentavam-se vacinados para os serogrupos *Canicola* e *Icterohaemorrhagiae*, o que pode ter conferido proteção cruzada aos mesmos, diminuindo a gravidade da infeção, tal como demonstrado por Bouvet et al. (2020). A taxa de mortalidade elevada no nosso estudo pode ainda ser motivada pela disponibilidade financeira dos detentores e ainda pelo parco recurso à diálise.

O desenvolvimento de hemorragia pulmonar foi a principal causa de morte registada, o que se verifica igualmente no estudo realizado por Knöpfler et al. (2017).

O estudo desenvolvido por Klopffleisch et al. (2010) contemplou a realização de necropsias a 15 cães verificando-se que estes apresentavam sinais de hemorragia pulmonar massiva em todos os lobos pulmonares enquanto a presença de hemorragias com origem noutros órgãos era diminuta. O facto de existir um tropismo evidente para os pulmões e a falta de envolvimento de outros órgãos nas manifestações hemorrágicas da infeção sugerem que o mecanismo subjacente a estes fenómenos é altamente seletivo para a microvasculatura pulmonar. Esta teoria é sustentada por novas descobertas na área da leptospirose humana,

descobertas estas que identificam os pulmões como alvos comuns em doenças que envolvam o desenvolvimento de inflamação sistémica (Medeiros et al. 2010).

Os mecanismos que determinam o papel dos pulmões nestas doenças não são ainda conhecidos, mas pensa-se que algumas citocinas possam ter um tropismo acentuado para as células endoteliais pulmonares. Por outro lado, a deposição de imunocomplexos nos septos alveolares foi apontada como outra justificação para o desenvolvimento de hemorragia pulmonar (Nally et al. 2004). No entanto, no estudo desenvolvido por Klopffleisch et al. (2010) estes não foram detetados.

O facto das hemorragias se concentrarem nos pulmões e não serem generalizadas afasta também a hipótese de alterações da hemostasia primária ou secundária. Por outro lado, o papel da trombocitopenia encontrada na maioria dos casos de leptospirose no desenvolvimento de hemorragia pulmonar é algo que ainda está por apurar.

5. Limitações

A primeira limitação encontrada no desenvolvimento do nosso estudo prende-se com o facto do mesmo ter um carácter retrospectivo, o que determinou que os dados incluídos no estudo fossem recolhidos das fichas clínicas dos animais estudados. O facto da amostra ser analisada retrospectivamente explica a razão pela qual nem todos os animais foram submetidos às mesmas análises bioquímicas, o que pode conduzir à subestimação ou sobrestimação de alguns resultados obtidos. Da mesma forma, as informações relativamente ao exame ecográfico estavam limitadas aos relatórios presentes nas fichas dos animais, relatórios estes que podem apresentar detalhes e extensões variáveis.

Outra das limitações associadas a este estudo passa pelo facto de nem sempre existir acesso às concentrações absolutas dos diferentes parâmetros incluídos nas análises bioquímicas, sendo que algumas vezes apenas era mencionado que as mesmas se encontravam aumentadas relativamente ao valor de referência. As circunstâncias anteriormente referidas impediram que fossem estabelecidos diferentes *scores* consoante os valores apresentados pelos animais que traduzissem diferentes níveis de gravidade, o que impediu, conseqüentemente, o estabelecimento de relações entre estes *scores* e outras variáveis em estudo.

A limitação mais evidente do estudo está relacionada com a dimensão reduzida da amostra, o que determina um menor poder estatístico do mesmo.

6. Conclusão

Tendo em conta o carácter zoonótico da leptospirose e a ainda a elevada mortalidade associada ao desenvolvimento da infeção em canídeos, é de extrema importância que contínuem a ser realizados estudos que visem um maior conhecimento da doença no que diz respeito, por exemplo, à transmissão entre hospedeiros, à patogenia e tratamentos que procurem diminuir a mortalidade associada à mesma.

Desta forma, a realização de estudos que procurem identificar quais os serogrupos que mais frequentemente originam casos de infeção em canídeos em Portugal e o cruzamento desta informação com as informações clínicas e mortalidade, poderá ser interessante de forma a caracterizar o comportamento desta doença no nosso país. Por outro lado, estudos que incluam uma avaliação da evolução dos resultados das diferentes análises, como bioquímicas e hemograma, durante a hospitalização podem permitir um conhecimento mais detalhado da progressão da doença e o estabelecimento de novas associações entre diferentes parâmetros, bem como serem úteis para a determinação de novos fatores de prognóstico.

Estudos que visem determinar quais os mecanismos subjacentes ao desenvolvimento de hemorragia pulmonar em casos de leptospirose são igualmente pertinentes, uma vez que esta é a principal causa de morte detetada neste e noutros estudos.

Não menos importante é a realização de estudos com o objetivo de determinar a extensão de cães portadores crónicos de *Leptospira* spp. em Portugal, visto que estes apresentam um papel fundamental na epidemiologia da doença uma vez que contribuem para a disseminação de bactérias no ambiente.

Parte IV - Referências bibliográficas

- Adin CA, Cowgill LD. 2000. Treatment and outcome of dogs with leptospirosis: 38 cases (1990-1098). *J Am Vet Med Assoc.* 216(3):371–375.
- Adler B, de la Peña Moctezuma A. 2010. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol.* 140(3–4):287–296.
- Arent ZJ, Andrews S, Adamama-Moraitou K, Gilmore C, Pardali D, Ellis WA. 2013. Emergence of novel *Leptospira* serovars: A need for adjusting vaccination policies for dogs? *Epidemiol Infect.* 141(6):1148–1153.
- Argyle SA, Batchelor D, Bexfield N, Chan DL, Featherstone H, Frowde P, Helm J, Hodgkiss-Geere H, Jackson H, Maddox T, et al. 2017. BSAVA Small Animal Formulary. Part A: Canine and Feline. 9th ed. Gloucester: British Small Animal Veterinary. p.26; 133-134.
- Azócar-Aedo L, Monti G. 2015. Meta-Analyses of Factors Associated with Leptospirosis in Domestic Dogs. *Zoonoses Public Health.* 63(4):328–336.
- Azócar-Aedo L, Smits H, Monti G. 2017. Diagnostic utility of an immunochromatography test for the detection of *Leptospira* IgM antibodies in domestic dogs. *Pesqui Vet Bras.* 37(7):708–712.
- Banfi E, Cinco M, Bellini M, Soranzo MR. 1982. The role of antibodies and serum complement in the interaction between macrophages and leptospire. *J Gen Microbiol.* 128(4):813–816.
- Barmettler R, Schweighauser A, Bigler S, Grooters AM, Francey T. 2011. Assessment of exposure to *Leptospira* serovars in veterinary staff and dog owners in contact with infected dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 238(2):183–188. doi:10.2460/javma.238.2.183.
- Barragan V, Chiriboga J, Miller E, Olivas S, Birdsell D, Hepp C, Hornstra H, Schupp JM, Morales M, Gonzalez M. 2016. High *Leptospira* Diversity in Animals and Humans Complicates the Search for Common Reservoirs of Human Disease in Rural Ecuador. *PLoS Negl Trop Dis.* 10(9).
- Barthélemy A, Magnin M, Pouzot-Nevoret C, Bonnet-Garin JM, Hugonnard M, Goy-Thollet I. 2017. Hemorrhagic, Hemostatic, and Thromboelastometric Disorders in 35 Dogs with a Clinical Diagnosis of Leptospirosis: A Prospective Study. *J Vet Intern Med.* 31(1):69–80.
- Birnbaum N, Barr SC, Center SA, Schermerhorn T, Randolph JF, Simpson KW. 1998. Naturally acquired leptospirosis in 36 dogs: Serological and clinicopathological features. *J Small Anim Pract.* 39(5):231–236.
- Bouvet J, Cariou C, Valfort W, Villard S, Hilaire F, Oberli F, Cupillard L, Guigal PM. 2016. Efficacy of a multivalent DAPPi-Lmulti canine vaccine against mortality, clinical signs, infection, bacterial excretion, renal carriage and renal lesions caused by *Leptospira* experimental challenges. *Vaccine Reports.* 6:23–28.
- Bouvet J, Lemaitre L, Cariou C, Scotto M, Blain C, Oberli F, Cupillard L, Guigal PM. 2020. A canine vaccine against *Leptospira* serovars Icterohaemorrhagiae, Canicola and Grippotyphosa provides cross protection against *Leptospira* serovar Copenhageni. *Vet Immunol Immunopathol.* 219
- Cárdenas NC, Infante GP, Pacheco DAR, Diaz JPD, Wagner DCM, Dias RA, Neto JSF, Amaku M, Vargas-Pinto P, Polo L, et al. 2018. Seroprevalence of *Leptospira* spp infection and its risk factors among domestic dogs in Bogotá Colombia. *Vet Anim Sci.* 6(April):64–68.
- Carr AR, Panciera DL, Kidd L. 2002. Prognostic factors for mortality and thromboembolism in canine immune-mediated hemolytic anemia: A retrospective study of 72 dogs. *J Vet Intern Med.* 16(5):504–509.

- Cermakova Z, Kucerova P, Pliskova L, Kubickova P. 2013. Real-time PCR method for the detection of the gene encoding surface lipoprotein LipL32 of pathogenic *Leptospira*: Use in the laboratory diagnosis of the acute form of leptospirosis. *Scand J Infect Dis*. 45(8):593–599.
- Chan KW, Hsu YH, Hu WL, Pan MJ, Lai JM, Huang KC, Chou SJ. 2014. Serological and PCR detection of feline *Leptospira* in Southern Taiwan. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 14(2):118–123.
- Cocker S, Richter K. 2017. In: Ettinger SJ, Feldman EC, Cote E, editors. *Diagnostic Evaluation of the Liver. Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 8th ed St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders; p. 1919-1934
- Collares-Pereira M. 1992. Contribuição para o estudo do género *Leptospira* em Portugal. [dissertação de doutoramento]. Lisboa: Faculdade de Ciências e Tecnologia - Universidade Nova de Lisboa.
- Cowgill L. 2016. Grading of acute kidney injury. [internet]. International Renal Interest Society. [accedido em 2020 Maio 18]. http://www.iris-kidney.com/pdf/4_ldc-revised-grading-of-acute-kidney-injury.pdf
- Curtis KM, Foster PC, Smith PS, Monn MP, Stillman BA, Chandrashekar R, Lappin MR, Goldstein RE. 2015. Performance of a recombinant LipL32 based rapid in-clinic ELISA (SNAP® Lepto) for the detection of antibodies against *Leptospira* in dogs. *Int J Appl Res Vet Med*. 13(3):182–189.
- Davies P, Aoyagi Y. 2017. Leptospirosis presenting as acute acalculous cholecystitis. *Clin Case Reports*. 5(11):1775–1779.
- Day MJ, Horzinek MC, Schultz RD, Squires RA. 2016. Guidelines for the vaccination of dogs and cats compiled by the vaccination guidelines group (VGG) of the world small animal veterinary association (WSAVA). *J Small Anim Pract*. 57:1–50.
- De Brito T, da Silva AMG, Abreu PAE. 2018. Pathology and pathogenesis of human leptospirosis: a commented review. *J Sao Paulo Inst Trop Med*. (January):1–10.
- De Oliveira D, Figueira CP, Zhan L, Pertile AC, Pedra GG, Gusmão IM, Wunder EA, Rodrigues G, Ramos EAG, Ko AI, et al. 2016. *Leptospira* in breast tissue and milk of urban Norway rats (*Rattus norvegicus*). *Epidemiol Infect*. 144(11):2420–2429.
- Delaude A, Rodriguez-Campos S, Dreyfus A, Counotte MJ, Francey T, Schweighauser A, Lettry S, Schuller S. 2017. Canine leptospirosis in Switzerland—A prospective cross-sectional study examining seroprevalence, risk factors and urinary shedding of pathogenic leptospires. *Prev Vet Med*. 141:48–60.
- Dey S, Madhan Mohan C, Ramadass P, Nachimuthu K. 2007. Recombinant antigen-based dipstick ELISA for the diagnosis of leptospirosis in dogs. *Vet Rec*. 160(6):186–188.
- Dey S, Mohan CM, Kumar TMAS, Ramadass P, Nainar AM, Nachimuthu K. 2004. Recombinant LipL32 antigen-based single serum dilution ELISA for detection of canine leptospirosis. *Vet Microbiol*. 103(1–2):99–106.
- Direcção-Geral da Saúde. 2017. Doenças de declaração obrigatória 2013-2016 (Vol. I). Lisboa: Ministério da Saúde.
- Effler P V., Bogard AK, Domen HY, Katz AR, Higa HY, Sasaki DM. 2002. Evaluation of eight rapid screening tests for acute leptospirosis in Hawaii. *J Clin Microbiol*. 40(4):1464–1469.
- Ellis W. 2010. Control of canine leptospirosis in Europe: Time for a change? *Vet Rec*. 167(16):602–605.

- Ellis W. 2015. Animal Leptospirosis. *Current topics in microbiology and immunology*. 387. 99-137.
- Eshghi A, Lourdault K, Murray GL, Bartpho T, Sermswan RW, Picardeau M, Adler B, Snarr B, Zuerner RL, Cameron CE. 2012. *Leptospira interrogans* catalase is required for resistance to H₂O₂ and for virulence. *Infect Immun*. 80(11):3892–3899.
- Forrest LJ, O'Brien RT, Tremelling MS, Steinberg H, Cooley AJ, Kerlin RL. 1998. Sonographic renal findings in 20 dogs with leptospirosis. *Vet Radiol Ultrasound*. 39(4):337–340.
- Fraga TR, Barbosa AS, Isaac L. 2011. Leptospirosis: Aspects of innate immunity, immunopathogenesis and immune evasion from the complement system. *Scand J Immunol*. 73(5):408–419.
- Fraga TR, Carvalho E, Isaac L, Barbosa AS. 2015. *Leptospira* and Leptospirosis. *Mol Med Microbiol Second Ed*. 3:1973–1990.
- Fraune C, Schweighauser A, Francey T. 2013. Evaluation of the diagnostic value of serologic microagglutination testing and a polymerase chain reaction assay for diagnosis of acute leptospirosis in dogs in a referral center. *J Am Vet Med Assoc*. 242(10):1373–1380.
- Ganoza CA, Matthias MA, Saito M, Cespedes M, Gotuzzo E, Vinetz JM. 2010. Asymptomatic renal colonization of humans in the Peruvian Amazon by *Leptospira*. *PLoS Negl Trop Dis*. 4(2).
- Gay N, Soupé MEG, Goarant C. 2014. Though not reservoirs, dogs might transmit *Leptospira* in New Caledonia. *Int J Environ Res Public Health*. 11(4):4316–4325.
- Geisen V, Stengel C, Brem S, Müller W, Greene C, Hartmann K. 2007. Canine leptospirosis infections - Clinical signs and outcome with different suspected *Leptospira* serogroups (42 cases). *J Small Anim Pract*. 48(6):324–328.
- Gendron K, Christe A, Walter S, Schweighauser A, Francey T, Doherr MG, Lang J. 2014. Serial CT features of pulmonary leptospirosis in 10 dogs. *Vet Rec*. 174(7):169.
- Gloor CI, Schweighauser A, Francey T, Rodriguez-Campos S, Vidondo B, Bigler B, Schuller S. 2017. Diagnostic value of two commercial chromatographic “patient-side” tests in the diagnosis of acute canine leptospirosis. *J Small Anim Pract*. 58(3):154–161.
- Goarant C. 2016. Leptospirosis: risk factors and management challenges in developing countries. *Res Rep Trop Med*. Volume 7:49–62.
- Goldstein RE. 2010. Canine Leptospirosis. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract*. 40(6):1091–1101.
- Goy-Thollot I, Djelouadji Z, Nennig M, Hazart G, Hugonnard M. 2018. Screening for *Leptospira* DNA in blood and urine from 30 apparently healthy dogs. *Rev Vet Clin*. 53(3):79–86.
- Grayzel SE, DeBess EE. 2016. Characterization of leptospirosis among dogs in Oregon, 2007–2011. *J Am Vet Med Assoc*. 248(8):908–915.
- Greene CE, Sykes JE, Moore GE, Goldstein RE, Schultz RD. 2012. Leptospirosis. In: Greene CE, editor. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 4th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders; p.431-447
- Guernier V, Lagadec E, Cordonin C, Le Minter G, Gomard Y, Pagès F, Jaffar-Bandjee MC, Michault A, Tortosa P, Dellagi K. 2016. Human Leptospirosis on Reunion Island, Indian Ocean: Are Rodents the (Only) Ones to Blame? *PLoS Negl Trop Dis*. 10(6):1–19.

- Guo YJ, Wang KY, Sun SH. 2010. Identification of an HLA-A*0201-restricted CD8+ T-cell epitope encoded within Leptospiral immunoglobulin-like protein A. *Microbes Infect.* 12(5):364–373.
- Gutierrez L, Mendoza J, Rangel AB, Tapia G, Bernad MJ, Sumano H. 2019. Outpatient Clinical Trial in Dogs With Leptospirosis Treated With Enrofloxacin Hydrochloride-Dihydrate (ENRO-C). *Front Vet Sci.* 6:1–9.
- Habus J, Persic Z, Spicic S, Vince S, Stritof Z, Milas Z, Cvetnic Z, Perharic M, Turk N. 2017. New trends in human and animal leptospirosis in Croatia, 2009–2014. *Acta Trop.* 168:1–8.
- Hamond C, Martins G, Bremont S, Medeiros MA, Bourhy P, Lilenbaum W. 2014. Predominance of *Leptospira interrogans* serovar Bratislava DNA in vaginal fluid of mares suggests sexual transmission of leptospirosis. *Anim Reprod Sci.* 151(3–4):275–279.
- Harkin K, Hays MP. 2016. Variable-number tandem-repeat analysis of leptospiral DNA isolated from canine urine samples molecularly confirmed to contain pathogenic leptospires. *J Am Vet Med Assoc.* 249(4):399–405.
- Harkin K, Roshto Y, Sullivan J. 2003. Clinical application of a polymerase chain reaction assay for diagnosis of leptospirosis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 222:1224-1229.
- Holloway A, O'Brien R. 2007. Perirenal effusion in dogs and cats with acute renal failure. *Vet Radiol Ultrasound.* 48(6):574–579.
- [IRIS]. 2019. IRIS staging of CKD. [acedido em 2020 Maio 18]. http://www.iriskidney.com/pdf/IRIS_Staging_of_CKD_modified_2019.pdf
- Jorge S, Schuch RA, de Oliveira NR, da Cunha CEP, Gomes CK, Oliveira TL, Rizzi C, Qadan AF, Pacce VD, Coelho Recuero AL, et al. 2017. Human and animal leptospirosis in Southern Brazil: A five-year retrospective study. *Travel Med Infect Dis.* 18:46–52.
- Khorami N, Malmasi A, Zakeri S, Salehi TZ, Abdollahpour G, Nassiri SM, Nejati A. 2010. Screening urinalysis in dogs with urinary shedding of leptospires. *Comp Clin Path.* 19(3):271–274.
- Kikuti M, Langoni H, Nobrega DN, Corrêa APFL, Ullmann LS. 2012. Occurrence and risk factors associated with canine leptospirosis. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 18(1):124–127.
- Kis I, Schweighauser A, Francey T. 2012. Long-term outcome of dogs with acute kidney injury. *Proceedings of ACVIM Forum; May 29-June 02; New Orleans, USA.* Greenwood Village (CO): American College of Veterinary Internal Medicine.
- Klaasen E, Adler B. 2015. Recent advances in canine leptospirosis: focus on vaccine development. *Vet Med Res Reports.* 6:245–260
- Klopfleisch R, Kohn B, Plog S, Weingart C, Nckler K, Mayer-Scholl A, Gruber AD. 2010. An emerging pulmonary haemorrhagic syndrome in dogs: Similar to the human leptospiral pulmonary haemorrhagic syndrome? *Vet Med Int.* 2010.
- Knöpfler S, Mayer-Scholl A, Luge E, Klopfleisch R, Gruber AD, Nöckler K, Kohn B. 2017. Evaluation of clinical, laboratory, imaging findings and outcome in 99 dogs with leptospirosis. *J Small Anim Pract.* 58(10):582–588. doi:10.1111/jsap.12718.
- Kodjo A, Calleja C, Loenser M, Lin D, Lizer J. 2016. A rapid in-clinic test detects acute leptospirosis in dogs with high sensitivity and specificity. *Biomed Res Int.* 2016(1):1–3.

- Kohn B, Steinicke K, Arndt G, Gruber AD, Guerra B, Jansen A, Kaser-Hotz B, Klopffleisch R, Lotz F, Luge E, et al. 2010. Pulmonary Abnormalities in Dogs with Leptospirosis. *J Vet Intern Med.* 24(6):1277–1282.
- Kucerova P, Cermakova Z, Pliskova L, Valenta Z, Pavlis O, Kubickova P. 2011. Comparison of results of two serological methods for diagnosing leptospirosis—microagglutination test and ELISA. *Klinicka mikrobiologie a infekcni lekarstvi.* 17(5):173–8.
- Lambert A, Takahashi N, Charon NW, Picardeau M. 2012. Chemotactic behavior of pathogenic and nonpathogenic *Leptospira* species. *Appl Environ Microbiol.* 78(23):8467–8469.
- Langston C. 2017. In: Ettinger SJ, Feldman EC, Cote E, editors. *Acute Kidney Injury. Textbook of Veterinary Internal Medicine.* 8th ed St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders; p. 1919-1934
- Lança SIO. 2011. Contribuição para o estudo da leptospirose canina em Portugal. [dissertação de mestrado]. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.
- Lau SF, Wong JY, Khor KH, Roslan MA, Abdul Rahman MS, Bejo SK, Radzi R, Bahaman AR. 2017. Seroprevalence of Leptospirosis in Working Dogs. *Top Companion Anim Med.* 32(4):121–125.
- Lelu M, Muñoz-Zanzi C, Higgins B, Galloway R. 2015. Seroepidemiology of leptospirosis in dogs from rural and slum communities of Los Rios Region, Chile. *BMC Vet Res.* 11(1).
- Levett PN. 2001. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev.* 14(2):296–326.
- Levett PN. 2015. *Leptospira* and Leptospirosis. *Systematics of Leptospiraceae. Current topics in microbiology and immunology.* 387. 11-20.
- Li S, Ojcius DM, Liao S, Li L, Xue F, Dong H, Yan J. 2010. Replication or death: Distinct fates of pathogenic *Leptospira* strain Lai within macrophages of human or mouse origin. *Innate Immun.* 16(2):80–92.
- Lizer J, Grahlmann M, Hapke H, Velineni S, Lin D, Kohn B. 2017. Evaluation of a rapid IgM detection test for diagnosis of acute leptospirosis in dogs. *Vet Rec.* 180(21):517.
- Lizer J, Velineni S, Weber A, Krecic M, Meeus P. 2018. Evaluation of 3 Serological Tests for Early Detection Of *Leptospira*-specific Antibodies in Experimentally Infected Dogs. *J Vet Intern Med.* 32(1):201–207. doi:10.1111/jvim.14865.
- López MC, Vila A, Rodón J, Roura X. 2019. *Leptospira* seroprevalence in owned dogs from Spain. *Heliyon.* 5(8).
- Major A, Schweighauser A, Francey T. 2014. Increasing incidence of canine leptospirosis in Switzerland. *Int J Environ Res Public Health.* 11(7):7242–7260.
- Mastorilli C, Dondi F, Agnoli C, Turba ME, Vezzali E, Gentilini F. 2007. Clinicopathologic Features and Outcome Predictors of *Leptospira interrogans* Australis Serogroup Infection in Dogs: A Retrospective Study of 20 Cases (2001–2004). *J Vet Intern Med.* 21. 3-10.
- Mattoon J, Nyland T. 2014. *Small Animal Diagnostic Ultrasound.* 3rd ed. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders
- Mayer-Scholl A, Luge E, Draeger A, Nöckler K, Kohn B. 2013. Distribution of *Leptospira* serogroups in dogs from Berlin, Germany. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 13(3):200–202.
- McCallum KE, Constantino-Casas F, Cullen JM, Warland JH, Swales H, Lingham N, Kortum AJ, Sterritt AJ, Cogan T, Watson PJ. 2019. Hepatic leptospiral infections in dogs without obvious renal involvement. *J Vet Intern Med.* 33(1):141–150.

- Meaudre É, Asencio Y, Montcriol A, Martinaud C, Graffin B, Palmier B, Goutorbe P. 2008. Immunomodulation au cours d'un cas de leptospirose grave avec défaillance multiviscérale : échanges plasmatiques, immunoglobulines ou corticoïdes? *Ann Fr Anesth Reanim.* 27(2):172–176.
- Medeiros F da R, Spichler A, Athanazio DA. 2010. Leptospirosis-associated disturbances of blood vessels, lungs and hemostasis. *Acta Trop.* 115(1–2):155–162.
- Midence JN, Leutenegger CM, Chandler AM, Goldstein RE. 2012. Effects of recent *Leptospira* vaccination on whole blood real-time PCR testing in healthy client-owned dogs. *J Vet Intern Med.* 26(1):149–152.
- Miller RI, Ross SP, Sullivan ND, Perkins NR. 2007. Clinical and epidemiological features of canine leptospirosis in North Queensland. *Aust Vet J.* 85(1–2):13–19.
- Miotto BA, Guilloux AGA, Tozzi BF, Moreno LZ, Da Hora AS, Dias RA, Heinemann MB, Moreno AM, de Souza Filho AF, Lilenbaum W, et al. 2018a. Prospective study of canine leptospirosis in shelter and stray dog populations: Identification of chronic carriers and different *Leptospira* species infecting dogs. *PLoS One.* 13(7):1–23.
- Miotto BA, Tozzi BF, Penteado M de S, Guilloux AGA, Moreno LZ, Heinemann MB, Moreno AM, Lilenbaum W, Hagiwara MK. 2018b. Diagnosis of acute canine leptospirosis using multiple laboratory tests and characterization of the isolated strains. *BMC Vet Res.* 14(1):1–9.
- Murray GL. 2015. The Molecular Basis of Leptospiral Pathogenesis. *Current topics in microbiology and immunology.* 387. 139-85.
- Nally JE, Chantranuwat C, Wu XY, Fishbein MC, Pereira MM, Pereira Da Silva JJ, Blanco DR, Lovett MA. 2004. Alveolar Septal Deposition of Immunoglobulin and Complement Parallels Pulmonary Hemorrhage in a Guinea Pig Model of Severe Pulmonary Leptospirosis. *Am J Pathol.* 164(3):1115–1127.
- Nally JE, Chow E, Fishbein MC, Blanco DR, Lovett MA. 2005. Changes in lipopolysaccharide O antigen distinguish acute versus chronic *Leptospira interrogans* infections. *Infect Immun.* 73(6):3251–3260.
- Niloofoa R, Fernando N, De Silva NL, Karunanayake L, Wickramasinghe H, Dikmadugoda N, Premawansa G, Wickramasinghe R, De Silva HJ, Premawansa S, et al. 2015. Diagnosis of leptospirosis: Comparison between microscopic agglutination test, IgM-ELISA and IgM rapid immunochromatography test. *PLoS One.* 10(6):1–12.
- Pappas G, Papadimitriou P, Siozopoulou V, Christou L, Akritidis N. 2008. The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. *Int J Infect Dis.* 12(4):351–357.
- Penninck D, d'Anjou M. 2015. *Atlas of Small Animal Ultrasonography.* 2nd ed. Iowa: John Wiley & Sons, Inc.
- Picardeau M, Bertherat E, Jancloes M, Skouloudis AN, Durski K, Hartskeerl RA. 2014. Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: Current tools and emerging technologies. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 78(1):1–8.
- Que-Gewirth NLS, Ribeiro AA, Kalb SR, Cotter RJ, Bulach DM, Adler B, Saint Girons I, Werts C, Raetz CRH. 2004. 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. *J Biol Chem.* 279(24):25420–25429.
- Raghavan R, Brenner K, Higgins J, Van der Merwe D, Harkin KR. 2011. Evaluations of land cover risk factors for canine leptospirosis: 94 cases (2002-2009). *Prev Vet Med.* 101(3–4):241–249.

- Raghavan RK, Brenner KM, Higgins JJ, Hutchinson JMS, Harkin KR. 2012. Evaluations of hydrologic risk factors for canine leptospirosis: 94 cases (2002-2009). *Prev Vet Med.* 107(1–2):105–109.
- Reagan KL, Sykes JE. 2019. Diagnosis of Canine Leptospirosis. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract.* 49(4):719–731.
- Rentko VT, Clark N, Ross LA, Schelling SH. 1992. Canine Leptospirosis: A Retrospective Study of 17 Cases. *J Vet Intern Med.* 6(4):235–244.
- Riediger IN, Stoddard RA, Ribeiro GS, Nakatani SM, Moreira SDR, Skraba I, Biondo AW, Reis MG, Hoffmaster AR, Vinetz JM, et al. 2017. Rapid, actionable diagnosis of urban epidemic leptospirosis using a pathogenic *Leptospira lipL32*-based real-time PCR assay. *PLoS Negl Trop Dis.* 11(9):1–14.
- Rodriguez J, Blais MC, Lapointe C, Arsenault J, Carioto L, Harel J. 2014. Serologic and urinary PCR survey of leptospirosis in healthy cats and in cats with kidney disease. *J Vet Intern Med.* 28(2):284–293.
- Rojas P, Monahan AM, Schuller S, Miller IS, Markey BK, Nally JE. 2010. Detection and quantification of leptospires in urine of dogs: A maintenance host for the zoonotic disease leptospirosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 29(10):1305–1309.
- Samir A, Soliman R, El-Hariri M, Abdel-Moein K, Hatem ME. 2015. Leptospirosis in animals and human contacts in Egypt: Broad range surveillance. *Rev Soc Bras Med Trop.* 48(3):272–277.
- Sant'Anna R, Vieira AS, Grapiglia J, Lilenbaum W. 2017. High number of asymptomatic dogs as leptospiral carriers in an endemic area indicates a serious public health concern. *Epidemiol Infect.* 145(9):1852–1854.
- Sant'Anna R, Vieira AS, Oliveira J, Lilenbaum W. 2018. Asymptomatic leptospiral infection is associated with canine chronic kidney disease. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 62:64–67.
- Scanziani E, Origi F, Giusti AM, Iacchia G, Vasino A, Pirovano G, Scarpa P, Tagliabue S. 2002. Serological survey of leptospiral infection in kennelled dogs in Italy. *J Small Anim Pract.* 43(4):154–157.
- Schneider MC, Najera P, Pereira MM, Machado G, dos Anjos CB, Rodrigues RO, Cavagni GM, Muñoz-Zanzi C, Corbellini LG, Leone M, et al. 2015. Leptospirosis in Rio Grande do Sul, Brazil: An Ecosystem Approach in the Animal-Human Interface. *PLoS Negl Trop Dis.* 9(11):1–20.
- Schuller S, Francey T, Hartmann K, Hugonnard M, Kohn B, Nally JE, Sykes J. 2015. European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats. *J Small Anim Pract.* 56(3):159–179.
- Schulz BS, Seybold N, Adamik KN, Ludwig E, Hartmann K. 2010. Ileocolic intestinal intussusception in a dog with leptospirosis. *Tierarztl Prax Ausgabe K Kleintiere - Heimtiere.* 38(6):403–405.
- Schweighauser A, Burgener IA, Gaschen F, Luckschander N, Hasler A, Lang J, Francey T. 2009. Small intestinal intussusception in five dogs with acute renal failure and suspected leptospirosis (*L. australis*). *J Vet Emerg Crit Care.* 19(4):363–368.
- Smith AM, Arruda AG, Evason MD, Weese JS, Wittum TE, Szlosek D, Stull JW. 2019. A cross-sectional study of environmental, dog, and human-related risk factors for positive canine leptospirosis PCR test results in the United States, 2009 to 2016. *BMC Vet Res.* 15(1):1–12.

- Sonet J, Barthélemy A, Goy-Thollot I, Pouzot-Nevoret C. 2017. Prospective evaluation of abdominal ultrasonographic findings in 35 dogs with leptospirosis. *Vet Radiol Ultrasound*. 59(1):98–106.
- Sykes JE. 2014. Leptospirosis. In: *Canine and Feline Infectious Diseases*. 1st ed. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders; p.474-486.
- Sykes JE, Hartmann K, Lunn KF, Moore GE, Stoddard RA, Goldstein RE. 2011. 2010 ACVIM Small Animal Consensus Statement on Leptospirosis: Diagnosis, Epidemiology, Treatment, and Prevention. *J Vet Intern Med*. 25(1):1–13.
- Syme H, Jepson R. 2017. In: Ettinger SJ, Feldman EC, Cote E, editors. *Clinical Approach and Laboratory Evaluation of Renal Disease. Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 8th ed St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders; p. 1919-1934
- Tangeman LE, Littman MP. 2013. Clinicopathologic and atypical features of naturally occurring leptospirosis in dogs: 51 cases (2000-2010). *J Am Vet Med Assoc*. 243(9):1316–1322.
- Troia R, Balboni A, Zamagni S, Frigo S, Magna L, Perissinotto L, Battilani M, Dondi F. 2018. Prospective evaluation of rapid point-of-care tests for the diagnosis of acute leptospirosis in dogs. *Vet J*. 237:37–42.
- Truccolo J, Charavay F, Merien F, Perolat P. 2002. Quantitative PCR assay to evaluate ampicillin, ofloxacin, and doxycycline for treatment of experimental leptospirosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 46(3):848–853.
- Vedhagiri K, Velineni S, Timoney JF, Shanmughapriya S, Vijayachari P, Narayanan R, Natarajaseenivasan K. 2013. Detection of LipL32-specific IgM by ELISA in sera of patients with a clinical diagnosis of leptospirosis. *Pathog Glob Health*. 107(3):130–135.
- Vernel-Pauillac F, Werts C. 2018. Recent findings related to immune responses against leptospirosis and novel strategies to prevent infection. *Microbes Infect*. 20(9–10):578–588.
- Vieira ML, Gama-Simões MJ, Collares-Pereira M. 2006. Human leptospirosis in Portugal: a retrospective study of eighteen years. *Int J Infect Dis*. 10(5):378–386.
- Ward MP, Glickman LT, Guptill LF. 2002. Prevalence of and risk factors for leptospirosis among dogs in the United States and Canada: 677 cases (1970-1998). *J Am Vet Med Assoc*. 220(1):53–58.
- Wilson S, Stirling C, Thomas A, King V, Plevová E, Chromá L, Siedek E, Illambas J, Salt J, Sture G. 2013a. A new multivalent (DHPPi/L4R) canine combination vaccine prevents infection, shedding and clinical signs following experimental challenge with four *Leptospira* serovars. *Vaccine*. 31(31):3131–3134.
- Wilson S, Stirling C, Thomas A, King V, Plevová E, Chromá L, Siedek E, Illambas J, Salt J, Sture G. 2013b. Duration of immunity of a multivalent (DHPPi/L4R) canine vaccine against four *Leptospira* serovars. *Vaccine*. 31(31):3126–3130.
- Winzelberg S, Tasse SM, Goldstein RE, Chapman PS, Benedict AG, Mason GD, Noble SJ, Curtis KM, Chandrashekar R. 2015. Evaluation of SNAP® Lepto in the diagnosis of leptospirosis infections in dogs: Twenty two clinical cases. *Int J Appl Res Vet Med*. 13(3):193–198.
- Xu C, Loftis A, Ahluwalia SK, Gao D, Verma A, Wang C, Kaltenboeck B. 2014. Diagnosis of canine leptospirosis by a highly sensitive FRET-PCR targeting the lig genes. *PLoS One*. 9(2):1–8.
- Zaidi S, Bouam A, Bessas A, Hezil D, Ghaoui H, Ait-Oudhia K, Drancourt M, Bitam I. 2018. Urinary shedding of pathogenic *Leptospira* in stray dogs and cats, Algiers: A prospective study. *PLoS One*. 13(5):1–11.