

## COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

## DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA LEPTOSPIROSE EM UM CÃO UTILIZANDO DIFERENTES TÉCNICAS

**R.C. Oliveira<sup>1</sup>, J.C. de Freitas<sup>1</sup>, F.G. Silva<sup>1</sup>, E.M. Souza<sup>1</sup>, Á.C.B. Delbem<sup>2</sup>, L.A. Alves<sup>1</sup>, E.E. Muller<sup>1</sup>, M.S. Balarim<sup>1</sup>, A.C.F. Reis<sup>1</sup>, T.N. Batista<sup>1</sup>, S.A. Vasconcellos<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, CP 6001, CEP 86051-990, Londrina, PR, Brasil. E-mail: freitasj@uel.br

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi descrever o quadro clínico de um cão com suspeita de leptospirose e os resultados dos exames específicos e complementares para leptospirose. A anamnese revelou que o animal apresentou episódios de vômito e dificuldade em apreender alimentos sólidos e líquidos. No exame clínico foi constatada desidratação de 5-7%, sensibilidade abdominal, hematoemese, melena, diarreia, necrose na língua, sialorréia e dificuldade de deglutição. Todos os exames considerados específicos, bacteriológico, direto da urina em microscópio de campo escuro, soroaglutinação microscópica e imunoperoxidase indireta do rim apresentaram resultados positivos. A estirpe de *Leptospira* isolada foi identificada como sorovar Canicola. Os exames complementares revelaram leucocitose com neutrofilia, hipocalcemia, hipoalbuminemia e valores séricos de uréia, creatinina e fosfatos acima dos valores normais enquanto a urinálise revelou proteinúria, leucocitúria e presença de células renais. As alterações renais encontradas no HE foram nefrite intersticial crônica e glomerulite com espessamento da membrana basal. Os sinais clínicos observados e os resultados dos exames laboratoriais indicaram um quadro predominantemente renal, compatível com a infecção pelo sorovar Canicola.

**PALAVRAS-CHAVE:** Leptospirose, sorovar Canicola, diagnóstico, cão, rim.

## ABSTRACT

**LABORATORIAL DIAGNOSIS OF LEPTOSPIROSIS IN ONE DOG USING DIFFERENT ASSAYS.** The purpose of this study was to describe the clinical features of a dog with leptospirosis suspicion, and results of specific and complementary laboratorial tests for leptospirosis. Anamnesis revealed that the animal presented vomiting, difficulty to apprehend both solid and liquid food. In the clinical examination, there was verified dehydration from 5 to 7%, hematoemesis, melena, diarrhea, tongue necrosis, sialorrhea and difficulty swallowing. All the specific tests, bacteriologic, direct examination of urine in dark field microscopy, microscopic agglutination test and indirect immunoperoxidase, were positive. The *Leptospira* strain isolated was identified as serovar Canicola. The complementary tests revealed leukocytosis with neutrophilia, hypocalcemia, hypoalbuminemia and blood values of urea, creatinine and phosphates over the normal values while urinalysis showed proteinuria, leukocyturia and presence of kidney cells. Kidney lesions found in HE were chronic interstitial nephritis and glomerulitis with thickened basement membrane. The clinical signs and the results of laboratorial tests found in this study indicated to predominantly to renal feature, consistent with an infection by serovar Canicola.

**KEY WORDS:** Leptospirosis, serovar Canicola, diagnosis, dog, kidney.

A leptospirose é uma zoonose mundialmente difundida, causada pela infecção por diferentes sorovares de *Leptospira* spp. O sorovar Canicola é um dos mais frequentes na leptospirose canina, sendo o próprio cão o reservatório deste sorovar (WOHL, 1996; SCANZIANI *et al.*, 1991). A doença nos cães pode ocorrer

na forma subclínica ou clínica, com evolução aguda ou crônica (FAINE *et al.*, 1999). Na fase de leptospiremia, o fígado é um dos primeiros locais a ser atingido, acarretando necrose dos hepatócitos, colestase intra-hepática com conseqüente diminuição da excreção da bilirrubina (WOHL, 1996; FAINE *et al.*, 1999). Após o

<sup>2</sup>Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, SP, Brasil.

surgimento dos anticorpos, as leptospirosas são encontradas quase que exclusivamente nos túbulos renais (VASCONCELLOS, 1987). A persistência de leptospirosas no rim pode ocasionar desde pequenos infiltrados inflamatórios focais a extensas lesões, caracterizadas por necrose celular, atrofia tubular e hemorragia renal, seguido de cicatrização e localização de leptospirosas na superfície luminal das células tubulares, sendo então eliminadas pela urina (BASKERVILE, 1986; FAINE *et al.*, 1999).

Para o diagnóstico da leptospirose canina é necessário a realização de exames laboratoriais, sendo o exame bacteriológico considerado definitivo (SANTA ROSA, 1970; FAINE *et al.*, 1999). A visualização direta de leptospirosas em microscópio de campo escuro tem sido utilizada principalmente em amostras de urina durante a fase de leptospirose. Entre as provas sorológicas, a soroprecipitação microscópica (SAM) com antígenos vivos é a mais utilizada em todo mundo (FAINE *et al.*, 1999). A prova de imunoperoxidase indireta, utilizando soro hiperimune com anticorpos contra sorovares de leptospirosas, tem sido utilizada para o diagnóstico da leptospirose em órgãos de animais infectados (SCANZIANI *et al.*, 1991). Provas laboratoriais como o hemograma, dosagem dos valores séricos de uréia e creatinina e urinálise, podem ser utilizadas como exames complementares, pois indicam as alterações funcionais nos diferentes órgãos acometidos, contribuindo assim para a avaliação clínica do animal (NAVARRO & KOCIBA, 1982).

No Brasil, a maioria dos trabalhos publicados sobre leptospirose canina é baseada apenas em provas sorológicas. O objetivo deste trabalho foi descrever o quadro clínico de um cão com leptospirose e os resultados dos exames, bacteriológico, da urina em microscópio de campo escuro, sorológico, imunistoquímico, histopatológico e de patologia clínica.

Um cão macho, sem raça definida, com 3 anos de idade, nunca vacinado contra leptospirose, com suspeita de leptospirose foi atendido no Hospital Veterinário (HV) da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Na anamnese, o proprietário relatou que há 15 dias o cão havia apresentado episódios de vômito que duraram cinco dias. Três dias antes do exame clínico foi observada dificuldade em apreender alimentos sólidos e líquidos. O exame clínico constatou desidratação de 5-7%, sensibilidade abdominal, hematoemese, melena, diarreia, necrose na língua, sialorréia e dificuldade de deglutição. Amostras de urina e sangue foram obtidas durante o exame clínico, respectivamente, por cistocentese e punção venosa. Na amostra de urina foi realizado o exame direto em microscópio de campo escuro (Olimpus - Modelo Bx40) (SANTA ROSA, 1970), cultura em meio EMJH modificado (ALVES, 1995), acrescido de antibióticos e urinálise (BROBST, 1989). A amostra de sangue foi

dividida em alíquotas, utilizadas para a realização do hemograma e análises bioquímicas - dosagem sérica de uréia, creatinina, colesterol, bilirrubina, fosfato, cálcio, magnésio, albumina, proteína total, fosfatase alcalina (FA), alanina amino transferase (ALT) e gama glutamil transferase (GGT). O soro obtido de outra alíquota de sangue foi utilizado para a realização da prova de soroprecipitação microscópica (SAM) com 22 sorovares de *Leptospira* spp. Nove dias após o atendimento clínico o animal veio a óbito. O exame histopatológico foi realizado em fragmentos de pulmão, fígado e rim corados por hematoxilina-eosina (HE). A prova de imunoperoxidase indireta utilizando soro hiperimune contra o sorovar Canicola foi realizada em fragmentos de fígado e rim (ELLIS *et al.*, 1983).

Resultados positivos foram encontrados em todos os exames específicos realizados para *Leptospira*. O exame direto da urina em microscópio de campo escuro revelou células com morfologia e movimentação compatíveis com leptospirosas. A urina semeada no meio de cultura EMJH com antibióticos apresentou crescimento de células de leptospirosas 20 dias após a semeadura. A estirpe isolada foi identificada como sorovar Canicola por anticorpos monoclonais (Royal Tropical Institute, Amsterdam, Holanda) e eletroforese de campo pulsado (Center of Disease Control, Estados Unidos da América). O exame direto da urina em microscópio de campo escuro e o isolamento em meio EMJH com antibióticos, quando realizados imediatamente após a colheita da urina aumentam as chances de um resultado positivo, uma vez que são dependentes da viabilidade da leptospira (SANTA ROSA, 1970; THIERMANN, 1980; FAINE *et al.*, 1999). A SAM detectou títulos positivos de 3.200 para os sorovares Canicola e Castelonis, de 800 para Pyrogenes e de 400 para Icterohaemorrhagiae e Butembo. Os altos títulos encontrados para vários sorovares, principalmente, para Canicola e Castelonis, podem ser considerados reações cruzadas, características da fase aguda da doença. A prova de imunoperoxidase indireta, nos rins, detectou leptospirosas coradas em castanho intenso na luz dos túbulos renais, enquanto o fígado foi negativo nesta prova. A imunoperoxidase indireta pode ser utilizada para o diagnóstico *pos-mortem* da leptospirose em órgãos e apresenta valor preditivo de um resultado positivo de 100% e de um negativo de 80% (SCANZIANI *et al.*, 1991). Os resultados positivos obtidos, no exame direto da urina, na cultura da urina e na prova de imunoperoxidase indireta confirmaram a passagem e a permanência, com conseqüente multiplicação, do sorovar Canicola no parênquima renal. No HE as alterações renais encontradas foram nefrite intersticial crônica e glomerulite com espessamento da membrana basal. As lesões hepáticas encontradas foram congestão vascular e sinusoidal, perda da

arquitetura hepática, tumefação celular e presença de células polimorfonucleares e nos pulmões foram observadas congestão de vasos, hemorragia, vasculite, pigmentação (+++) e presença de células polimorfonucleares. As lesões observadas no parênquima hepático e pulmonar provavelmente foram resultantes da multiplicação do microrganismo na fase de leptospiremia, mas com o aparecimento de anticorpos, confirmados pela SAM, as leptospirosas foram eliminadas do fígado e da maioria dos órgãos acometidos, permanecendo então nos rins. Entre os exames de patologia clínica realizados, o hemograma (Tabela 1) apresentou valores fora dos parâmetros considerados normais, principalmente, a leucocitose com neutrofilia. Nas análises bioquímicas, interpretadas segundo KANEKO *et al.* (1997), foram detectadas hipocalcemia (7,23 mg/dL), hipoalbuminemia (1,92 g/dL) e valores séricos de uréia, creatinina e fosfatos de 148 mg/dL, 3,64 mg/dL e 9,8 mg/dL respectivamente, considerados acima dos valores normais. Os valores séricos da ALT (21,5 U/L), FA (88 U/L), GGT (5 U/L), colesterol (138 mg/dL) e bilirrubina (total, 0,44 mg/dL; direta, 0,39 mg/dL; indireta, 0,05 mg/dL) estavam dentro da normalidade. Na urinálise foram detectadas proteinúria (+), leucocitúria (18 leucócitos/campo) e presença de células renais (12 células/campo). A permanência do sorovar Canicola nos rins, ocasionou alterações funcionais neste órgão, detectadas pelos exames complementares realizados nas amostras de sangue e urina. A manutenção da função hepática no cão estudado pode ser demonstrada pela normalidade dos valores séricos obtidos na análise bioquímica. Assim é provável que a hipoalbuminemia detectada seja decorrente da alteração da função renal e não da função hepática.

Tabela 1 - Valores dos parâmetros hematológicos de um cão positivo para *Leptospira interrogans* sorovar Canicola. Londrina - Paraná, 2004.

Variável	Valores encontrados	Valores de referência*
VG (%)	54	37 - 55
Hb (g/dL)	17,2	12 - 18
Hemácias x 10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	9	5,5 - 8,5
Leucócitos/μL	16.600	6.000 - 17.000
Segmentados/μL	14.442	3.000 - 11.500
Linfócitos/μL	830	1.000 - 4.800
Monócitos/μL	1.328	150 - 1.350
Plaquetas/μL	345.000	200.000 - 500.000

\*FELDMAN *et al.* (2000).

Os sinais clínicos do animal, relatados pelo proprietário e detectados no exame clínico, são compatíveis com a infecção pelo sorovar Canicola que causa um quadro predominantemente renal (Faine *et al.*, 1999).

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, C.J. *Influência de fatores ambientais sobre a proporção de caprinos soro-reatores para leptospirose em cinco centros de criação do Estado da Paraíba, Brasil*. São Paulo: 1995. 104p. [Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo].
- BASKERVILE, A. Histopathological aspects of diagnosis of leptospirosis. In: ELLIS, W.A. & LITTLE, T.W.A. (Eds.). *The present state of leptospirosis diagnosis and control*. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1986. p.33-43.
- BROBST, D. Urinalysis and associated laboratory procedures. *Vet. Clin. North Am.*, v.19, n.5, p.929-950, 1989.
- ELLIS, T.M.; ROBERTSON, G.M.; HUSTAS, L.; KIRBY, M. Detection of leptospires in tissue using an immunoperoxidase staining procedure. *Aust. Vet. J.*, v.60, n.12, p.364-367, 1983.
- FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. *Leptospira and leptospirosis*. 2.ed. Melbourne: Medisci, 1999. 272p.
- FELDMAN, B. F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. *Shalm's veterinary hematology*. 5.ed. Lippincott: Williams & Wilkins, 2000. 1344p.
- KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5.ed. San Diego: Academic Press, 1997. 932 p.
- NAVARRO, C.E.K. & KOCIBA, G.J. Hemostatis changes in dogs with experimental *Leptospira interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae* infection. *Am. J. Vet. Res.*, v.43, n.5, p.904-906, 1982.
- SANTA ROSA, C.A. Diagnóstico laboratorial das leptospiroses. *Rev. Microbiol.*, v.1, n.2, 1970.
- SCANZIANI, E.; LUINI, M.; FABBÌ, M.; PIZZOCARO, P. Comparison between specific immunoperoxidase staining and bacteriological culture in the diagnosis of renal leptospirosis of pigs. *Res. Vet. Sci.*, v.50, p.229-232, 1991.
- THIERMANN, A.B. Canine leptospirosis in Detroit. *Am. J. Vet. Res.*, v.41, n.10, p.1659-1661, 1980.
- VASCONCELLOS, S.A. O papel dos reservatórios na manutenção da leptospirose na natureza. *Comum. Cient. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo.*, v.11, n.1, p.17-24, 1987.
- WOHL, J.S. Canine leptospirosis. *Comp. Cont. Ed. Pract. Vet.*, v.18, n.11, p.1215-1241, 1996.

Recebido em 14/2/05

Aceito em 25/3/05