



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

CONTRIBUTO PARA O ESTUDO DA LEPTOSPIROSE CANINA NA GRANDE ÁREA
METROPOLITANA DE LISBOA

RUI BRUNO VARELA DA SILVA DUARTE

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Fernando Jorge Silvano Boinas
Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza
Dra. Sofia Brazão Domingues

ORIENTADORA

Dra. Sofia Brazão Domingues

CO-ORIENTADORA

Doutora Esmeralda Sofia da
Costa Delgado

2015
LISBOA

À minha irmã Mara.

Agradecimentos

Agradeço a toda a equipa do Hospital Veterinário do Atlântico (HVA), Dr. Nuno Silva, Dr. Rui Lemos Ferreira, Dra. Ana Raposo, Dra. Ana Santos, Dra. Margarida Monteiro, Enf. Vanessa, Enf. Joana, Enf. Irina, Enf. Sara e Enf. Filipe, pela paciência, bom humor e todas as oportunidades de aprendizagem que me proporcionaram e fizeram do meu estágio a experiência única que foi. Um especial agradecimento ao Dr. Rui Máximo, pela preciosa ajuda na escolha do tema que deu origem a esta tese e, claro, um agradecimento não menos especial à Dra. Sofia Domingues, pela implacável orientação durante o estágio e desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço à Dra. Sofia Zamith e a toda a equipa do Hospital Veterinário do Restelo (HVR) pelo contributo neste trabalho e pela disponibilidade oferecida.

Agradeço à minha co-orientadora Prof. Dra. Esmeralda Delgado, pelos conselhos e revisões oferecidos durante o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ao Dr. Rafael Figuera por tão prontamente disponibilizar as imagens da sua autoria, incluídas no capítulo referente à Anatomia Patológica da presente dissertação.

Aos meus pais deixo o maior agradecimento, por não deixarem que me falte nada, pelas oportunidades por eles criadas e pelos mais sábios conselhos de vida. Agradeço aos meus irmãos, Nádia, Afonso e Mara, porque se um bom futuro me espera foi porque sempre quis ser como eles. E claro, aos meus queridos sobrinhos, Yasmin, Miguel, Magalie, Beatriz e Melissa, pelos sorrisos que adicionam à minha vida.

Aproveito esta oportunidade para agradecer à grande VETuna, família unida pelo espírito académico e paixão pela música, da qual guardarei as melhores experiências e amizades vividas na faculdade.

Obrigado Raquel, Ricardo e Sara, pelos momentos cocó, ranheta, facada e ponto final! Obrigado Xôs, Gabi, Catarina, Maria, Bruna, Virgínia, Eloy, Alex, Cotta e Zé, unidos na luta contra a depressão dos exames.

Obrigado Sónia e Sofia, por ajudarem a tornar o Erasmus em Barcelona na experiência que foi e obrigado Krebs e Manu por tão calorosamente me receberem em Padova.

Obrigado Baiuca e Nuno, por serem quem são e estarem quando estão.

Obrigado Fofinha e Macky, por me ensinarem a ser melhor pessoa antes de ser Médico Veterinário, obrigado Dizzy, Becas, Paxa, King, Billie, Bobby (Robin), Lucky, Mogly, Lua, Baco e Zequinha e a todos os animais que passaram na minha vida.

Resumo

Contributo para o Estudo da Leptospirose Canina na Grande Área Metropolitana de Lisboa

Com o objectivo de contribuir para a caracterização clínica da leptospirose canina na Grande Área Metropolitana de Lisboa, realizou-se um estudo retrospectivo com a contribuição de três unidades hospitalares veterinárias da área, entre Janeiro de 2014 e Março de 2015. Investigou-se epidemiologia, métodos de diagnóstico, sinais clínicos, resultados laboratoriais, terapêutica, taxa de sobrevivência e indicadores de prognóstico. A análise estatística foi feita, recorrendo ao teste exacto de Fischer, risco relativo e teste Kruskal-Wallis.

Foram diagnosticados 28 cães com leptospirose, 16 machos (57%) e 12 fêmeas (43%). O ELISA foi o método de diagnóstico laboratorial mais utilizado (61%). Os sinais clínicos mais frequentes foram vômito (71%), letargia (68%) e anorexia (57%). No hemograma destacaram-se leucocitose com neutrofilia (71%), anemia (40%) e trombocitopenia (42%). Houve quadro renal em 93% dos casos, hepático em 75% e pulmonar em 61%. A hepatomegalia (48%) e a renomegalia (43%) foram as alterações mais frequentes na ecografia abdominal.

A ampicilina foi o antibiótico mais utilizado (64%), seguido da doxiciclina (50%).

A taxa de sobrevivência foi de 43%, sendo a hemorragia pulmonar a principal causa de morte (81%). Neutrofilia e quadro pulmonar aumentaram o risco de mortalidade da doença em 4 vezes ($p=0,048$) e 4,5 vezes ($p=0,0013$) respectivamente, apresentando-se como potenciais indicadores de prognóstico.

Seria necessário um estudo com maior casuística e mais dados laboratoriais e de imagiologia para uma avaliação epidemiológica da doença mais completa e investigação de mais indicadores de prognóstico.

Palavras-chave: Leptospirose canina, Quadro clínico, Hemorragia pulmonar, Tratamento, Prognóstico, Cão.

Abstract

Contribution for the Study of Canine Leptospirosis in the Large Metropolitan Area of Lisbon

As a contribution to the clinical characterization of the canine leptospirosis in the Large Metropolitan Area of Lisbon, a retrospective study was performed with the collaboration of three veterinary hospitals within the area, between January 2014 and March 2015. The following parameters were analyzed: epidemiology, diagnosis criteria, clinical signs, laboratorial results, therapy, survival rate and outcome predictors. Statistical data was analyzed with Fisher exact test, relative risk and Kruskal-Wallis test.

Leptospirosis was diagnosed in 28 animals, 16 males (57%) and 12 females (43%). ELISA was the most frequently used laboratorial diagnosis method (61%). The most frequent clinical signs were vomit (71%), lethargy (68%) and anorexia (57%). In the complete blood count neutrophilic leukocytosis (71%), anaemia (40%) and thrombocytosis (42%) were predominant. There was renal presentation in 93% of the cases, hepatic presentation in 75% and pulmonary presentation in 61%. Hepatomegaly (48%) and renomegaly (43%) were the most frequent alteration in the abdominal ultrasound.

Ampicilin was the chosen antibiotic in most cases (64%), followed by doxyciclin (50%).

The survival rate was 43%, with the pulmonary haemorrhage as the main cause of death (81%). The presence of neutrophilia and the development of pulmonary presentation increased the risk of mortality in 4 times ($p=0,048$) and 4,5 times ($p=0,0013$) respectively, representing possible outcome predictors.

Further studies with more clinical cases and more laboratorial and imaging data would be necessary for an improved epidemiological characterisation of the disease and investigation of more outcome predictors.

Key-words: Canine leptospirosis, Clinical presentation, Pulmonary haemorrhage, Treatment, Prognosis, Dog.

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract.....	vii
Lista de Quadros.....	xiii
Lista de Figuras	xiv
Lista de Abreviaturas e Siglas	xv
I - Introdução	1
1. Estágio Curricular - Hospital Veterinário do Atlântico.....	1
1.1 Unidade de Hospitalização.....	1
1.2 Consultório de medicina.....	2
1.3 Bloco operatório.....	2
1.4 Formação.....	3
2. Estágio extra-curricular - Hospital Escolar Veterinário – Faculdade de Medicina Veterinária	3
3. Estágio extra-curricular - Queen Mother Hospital for Animals – Royal Veterinary College	3
II - Revisão Bibliográfica – Leptospirose Canina	5
1. Etiologia	5
2. Epidemiologia.....	8
2.1 Factores de risco.....	8
2.2 Serogrupo e hospedeiros reservatório	9
2.3 Epidemiologia na Europa	10
2.4 Epidemiologia em Portugal	11
2.5 O gato e o seu papel como hospedeiro reservatório.....	12
3. Fisiopatologia e Quadros Clínicos no cão	13
3.1 Infecção hiperaguda	13
3.2 Infecção aguda.....	13
3.3 Quadro renal.....	14
3.4 Quadro hepático	14
3.5 Quadro gastrointestinal	15
3.6 Quadro pulmonar.....	15
3.7 Outra sintomatologia.....	15
3.8 Quadro clínico e o diagnóstico.....	16

3.9 Quadro clínico e o serovar	16
4. Diagnóstico laboratorial	18
4.1 Hemograma e tempos de coagulação	18
4.2 Análises bioquímicas	18
4.3 Urinálise	19
5. Diagnóstico imagiológico	20
5.1 Sinais radiológicos	20
5.2 Sinais ecográficos	21
6. Diagnóstico Sorológico	22
6.1 Teste de aglutinação microscópica	22
6.2 <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA)	24
6.3 Outros imunoensaios	25
7. Diagnóstico bacteriológico e molecular	26
7.1 Cultura bacteriana	26
7.2 Microscopia de fundo escuro	26
7.3 Imunodeteção	27
7.4 Detecção genética	27
8. Anatomia Patológica	29
8.1 Achados macroscópicos	29
8.2 Achados histológicos	31
9. Terapêutica	34
9.1 Antibioterapia	34
9.2 Terapia de suporte	35
9.3 Monitorização hospitalar	36
9.4 Seguimento clínico	36
10. Prognóstico	37
10.1 Mortalidade (taxa de sobrevivência)	37
10.2 Indicadores de prognóstico	37
10.3 Resposta à terapêutica	38
11. Prevenção	39
11.1 Vacinação	39
11.2 Outros métodos de prevenção	41
12. Saúde Pública	42
12.1 Leptospirose humana	42
12.2 O Homem e o risco de exposição	43
12.3 Risco zoonótico no hospital veterinário	44

12.4 Risco zoonótico em casa	45
III - Estudo Clínico	47
1. Objectivos	47
2. Material e Métodos	47
2.1 População em estudo	47
2.2 Distribuição sazonal	48
2.3 Diagnóstico.....	48
2.4 Situação	48
2.5 Anamnese e Exame Clínico	48
2.6 Hemograma, Bioquímicas e Ionograma.....	49
2.7 Urianálise	49
2.8 Imagiologia.....	49
2.9 Tratamento e Hospitalização	49
2.10 Estatística	49
3. Resultados.....	50
3.1 População em estudo	50
3.2 Distribuição sazonal	51
3.3 Diagnóstico.....	52
3.4 Sinais Clínicos.....	53
3.5 Hemograma e Análises Bioquímicas	55
3.6 Urianálise	55
3.7 Imagiologia.....	56
3.8 Terapêutica e Evolução clínica	57
3.9 Indicadores de Prognóstico	58
4. Discussão	60
4.1 Critérios de inclusão.....	60
4.2 Diagnóstico.....	60
4.3 Epidemiologia	63
4.4 Sinais Clínicos.....	63
4.5 Hemograma e Análises Bioquímicas	65
4.6 Urianálise	66
4.7 Imagiologia.....	66
4.8 Terapêutica e Evolução Clínica.....	67
4.9 Indicadores de Prognóstico	69
IV - Conclusão.....	71
V - Bibliografia.....	75

VI – Anexos	81
Anexo I – Formulário para a recolha dos dados analisados no estudo clínico.....	81
Anexo II – Listagem dos dados obtidos pelo preenchimento dos formulários, para análise no estudo clínico.....	84
Anexo III – Resultados da tabulação cruzada (valores de p)	94

Lista de Quadros

Quadro 1 – Serogrupos e alguns serovares de <i>L. interrogans sensu lato</i>	7
Quadro 2 - Exemplo de serovares de <i>Leptospira interrogans</i> e <i>Leptospira kirschneri</i> que infectam o cão e potenciais hospedeiros reservatório.	9
Quadro 3 – Número de Leptospirose humana notificados em Portugal entre 2002 e 2006.	43
Quadro 4 – Número de casos de Leptospirose Humana notificados, por classificação de caso e por ano, em Portugal entre 2009 e 2012.	43
Quadro 5 – Lista das raças apresentadas no estudo e sua frequência.....	50
Quadro 6 - Frequência das idades observadas no estudo, agrupadas em grupos etários.....	51
Quadro 7 – Frequência de casos confirmados, suspeita forte, suspeita moderada e suspeita leve por cada unidade hospitalar incluída no estudo clínico.	52
Quadro 8 – Serogrupos suspeitos e respectivas titulações, nos 8 casos em que foi realizado MAT.	53
Quadro 9 – Lista de sinais clínicos obtidos pela anamnese recolhida no dia de apresentação e suas frequências.	53
Quadro 10 - Lista das combinações mais frequentes de sinais clínicos obtidos pela anamnese recolhida no dia de apresentação e suas frequências.	54
Quadro 11 - Lista de sinais clínicos obtidos no exame clínico realizado no dia de apresentação e suas frequências.	54
Quadro 12 - Parâmetros de urianálise pesquisados e suas frequências no presente estudo clínico.	56
Quadro 13 – Lista de alterações renais, hepáticas e outras no exame ecográfico abdominal e suas frequências.	57
Quadro 14 – Lista de antibióticos utilizados no tratamento e sua frequência.	58
Quadro 15 – Página 1 da listagem de dados obtidos pelo preenchimento do formulário.	84
Quadro 16 – Página 2 da listagem de dados obtidos pelo preenchimento do formulário.	85
Quadro 17 – Página 3 da listagem de dados obtidos pelo preenchimento do formulário.	86
Quadro 18 – Página 4 da listagem de dados obtidos pelo preenchimento do formulário.	87
Quadro 19 – Página 5 da listagem de dados obtidos pelo preenchimento do formulário.	88
Quadro 20 – Página 6 da listagem de dados obtidos pelo preenchimento do formulário.	89
Quadro 21 – Página 7 da listagem de dados obtidos pelo preenchimento do formulário.	90
Quadro 22 – Página 8 da listagem de dados obtidos pelo preenchimento do formulário.	91
Quadro 23 – Página 9 da listagem de dados obtidos pelo preenchimento do formulário.	92
Quadro 24 – Página 10 da listagem de dados obtidos pelo preenchimento do formulário.	93
Quadro 25 – Resultados da tabulação cruzada entre o sexo do e a alta e entre os casos de referência e a alta (valor de p).	94
Quadro 26 – Resultados da tabulação cruzada entre os sinais de anamnese e exame clínico e a alta (valor de p).....	94
Quadro 27 – Resultados da tabulação cruzada entre os sinais de hemograma e a alta (valor de p).....	95
Quadro 28 – Resultados da tabulação cruzada entre os sinais de hemograma e a presença de quadro pulmonar durante a hospitalização (valor de p).	95
Quadro 29 - Resultados da tabulação cruzada entre os sinais de bioquímicos e a alta (valor de p).....	95
Quadro 30 - Resultados da tabulação cruzada entre os sinais de urianálise e a alta (valor de p).	96
Quadro 31 - Resultados da tabulação cruzada entre os sinais ecográficos e a alta (valor de p).	96

Quadro 32 - Resultados da tabulação cruzada entre terapêutica e a alta e entre a evolução clínica e a alta (valor de p).	96
Quadro 33 - Resultados da tabulação cruzada entre a média da idade e a alta e entre a média dos dias de hospitalização e a alta (valor de p).	96

Lista de Figuras

Figura 1 – Ultraestrutura das leptospirosas patogênicas (Adaptado de Greene, 2012).	6
Figura 2 – Imagem radiográfica, evidenciando padrão alveolar/intersticial difuso, de um cão com leptospirose que morreu posteriormente com hemorragia pulmonar (gentilmente cedido por HVA).	20
Figura 3 – Imagem ecográfica renal de um cão com leptospirose, apresentando renomegália e hiperecogenicidade do córtex renal e ligeira efusão perirenal (gentilmente cedido por Dr. Rui Lemos Ferreira).	21
Figura 4 – A, Intensa coloração amarela da cortical num rim de cão com leptospirose. B, Hemorragias multifocais num rim amarelo pálido de um cão com leptospirose (gentilmente cedido por Dr. Rafael Fighera).	29
Figura 5 – Rins retraídos e fibróticos de um cão diagnosticado previamente com leptospirose (há 5 meses) O cão tinha sido tratado, encontrando-se saudável na altura da morte por um acidente rodoviário (Greene, 2012).	29
Figura 6 – Fígado aumentado de volume e necrótico de um cão com leptospirose aguda (Greene, 2012).	30
Figura 7 – Lesões de hemorragia pulmonar de um cão com leptospirose (gentilmente cedido por Dr. Rafael Fighera).	30
Figura 8 – Lesões renais na leptospirose canina. Acentuada degeneração e necrose das células epiteliais tubulares no rim, H&E, 200x (gentilmente cedido por Dr. Rafael Fighera).	31
Figura 9 –A, Alterações hepáticas mínimas e colestase grave num cão com leptospirose anúrica. As concentrações séricas da FAS e da bilirrubina total apresentavam-se ligeiramente aumentadas (Sykes, 2014). B, Acentuada dissociação dos cordões de hepatócitos num fígado com número aumentado de hepatócitos binucleados, na leptospirose canina. H&E, 200x (gentilmente cedido por Dr. Rafael Fighera).	32
Figura 10 – Hemorragia pulmonar aguda num cão com leptospirose aguda. Os alvéolos contêm eritrócitos livres em grande número. Presença de neutrófilos marginalizados no interior dos vasos sanguíneos (setas). Coloração H&E, 400x. (Greene, 2012).	33
Figura 11 - Distribuição do número de casos, incluídos no estudo clínico, em função do mês de apresentação em consulta.	51
Figura 12 – Página 1 do formulário para a recolha dos dados analisados no estudo clínico... ..	81
Figura 13 - Página 2 do formulário para a recolha dos dados analisados no estudo clínico.... ..	82
Figura 14 - Página 3 do formulário para a recolha dos dados analisados no estudo clínico.... ..	83

Lista de Abreviaturas e Siglas

µm - micrómetro
ACVIM - Colégio Americano de Medicina Interna Veterinária
ADN - ácido desoxirribonucleico
AIM – Autorização de Introdução no Mercado
ALT - alanina aminotransferase
AST - aspartato aminotransferase
CAAT - teste de absorção de aglutinação cruzada
CAMV - centro de atendimento médico veterinário
CID - coagulação intravascular disseminada
CK - creatina quinase
CRP - proteína C reactiva
DGS - Direcção Geral da Saúde
dL - decilitro
ECG - electrocardiograma
ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
FAS - fosfatase alcalina
FMV - Faculdade de Medicina Veterinária
h - hora
HEV - Hospital Escolar Veterinário
Hpt - haptoglobina
HVA - Hospital Veterinário do Atlântico
HVR - Hospital Veterinário do Restelo
IgG - imunoglobulina G
IgM - imunoglobulina M
IHA - ensaio de hemaglutinação indirecta
INIAV - Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária
IV - intra-venoso
kg - quilograma
LAMP - *loop-mediated isothermal amplification*
LPHS - síndrome de hemorragia pulmonar leptospiral
LPS - lipopolissacáridos
MAT - teste de microaglutinação
mg - miligrama
mL - mililitro
PCR - *polimerase chain reaction*
PLI - imunoreactividade sérica da lipase pancreática
PO - *per os*
QMHA - *Queen Mother Hospital for Animals*
RVC - *Royal Veterinary College*
SRIS - síndrome de resposta inflamatória sistémica
U - unidade internacional
UAC - albumina e creatinina urinárias
ULisboa - Universidade de Lisboa
UPC - proteína e creatinina urinárias
VGG - *Vaccination Guidelines Group*
WSAVA - *World Small Animal Veterinary Association*

I - Introdução

A presente dissertação foi realizada no âmbito do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa.

Realizei um estágio curricular no Hospital Veterinário do Atlântico (HVA), onde contactei com oito casos de leptospirose canina. Na presença de quadros clínicos graves, onde sete dos casos apresentaram envolvimento pulmonar, a taxa de sobrevivência face a esta doença aparentou ser baixa. Após o contacto com alguns clínicos, do HVA e de outras unidades hospitalares, a maioria foi da opinião que, para além do surgimento de um elevado número de casos de leptospirose canina, superior ao habitual, a doença apresentar-se-ia com um quadro antes pouco presenciado, mais grave e com envolvimento pulmonar. Por outro lado, não existiu um consenso sobre o melhor método de confirmação laboratorial da doença.

A presente dissertação surgiu com o objectivo de reunir a bibliografia mais recente acerca da leptospirose canina, a fim de a comparar com a apresentação da doença observada durante o meu estágio curricular. Aspectos como diagnóstico, terapêutica, prevenção e saúde pública também foram investigados, com destaque para a pesquisa de indicadores de prognóstico.

1. Estágio Curricular - Hospital Veterinário do Atlântico

Desenvolvi o meu estágio curricular no Hospital Veterinário do Atlântico (HVA), situado em Mafra, durante um período de seis meses, entre 1 de Setembro de 2014 e 27 de Fevereiro de 2015, perfazendo um total de 1280 horas. Durante este período acompanhei todas as áreas clínicas oferecidas pelo hospital sob a orientação da Dra. Sofia Domingues.

1.1 Unidade de Hospitalização

Desenvolvi trabalho nas unidades de hospitalização de cães, de gatos, de animais exóticos e na unidade de doenças infecto-contagiosas. Participei no trabalho de rotina hospitalar que passa pelo manejo e tratamento dos animais internados. Adquiritreino e particular autonomia nas tarefas de enfermagem como a manutenção da higiene das jaulas e dos animais, alimentação, correcta contenção e preparação dos animais para procedimentos médicos e cirúrgicos, colocação e manutenção de catéteres endovenosos, monitorizações periódicas dos parâmetros vitais e de bem-estar dos animais, administração de medicação oral, endovenosa,

subcutânea, intramuscular e ocular, limpeza e desinfecção de feridas e realização de pensos. Participei na administração de agentes quimioterápicos, no entanto, sempre com supervisão de um Médico Veterinário ou Enfermeiro.

Realizei por rotina análises sanguíneas, exames radiográficos e participei nos exames ecográficos. Nesta unidade tive a oportunidade de assistir a um exame de rinoscopia.

Com a devida supervisão, exerci actos médicos mais invasivos como gastrocentese para decompressão gástrica numa dilatação e volvo gástrico, toracocentese para drenagem de derrame pleural e cistocentese ecoguiada para colheita de urina.

Tive também oportunidade de participar na discussão dos casos clínicos, acompanhando as rondas médicas e as decisões tomadas pelos médicos responsáveis.

1.2 Consultório de medicina

Assisti a grande parte das consultas médicas que ocorreram no hospital durante o meu horário de trabalho. Participei no atendimento de consultas de primeira opinião e consultas de rotina (consulta pós-adopção, consulta de vacinação, consulta pré-cirúrgica), através da recepção dos pacientes e clientes no consultório, recolha da anamnese, realização de exame físico, discussão do caso com o clínico responsável e tomada de decisões clínicas, preparação e administração de medicação, troca de pensos e preenchimento das fichas clínicas.

Assisti a consultas de referência, com ênfase nas áreas de dermatologia, cardiologia, medicina interna, traumatologia, oftalmologia, neurologia, diagnóstico de imagem e medicina de exóticos. A minha participação nas consultas de referência consistiu na contenção dos pacientes, realização de exame físico, execução de análises sanguíneas e radiografias e preparação de medicamentos.

1.3 Bloco operatório

No bloco operatório entrei em contacto com diversa casuística cirúrgica como cirurgia reproductiva (ovariohisterectomia, orquiectomia), cirurgia gastro-intestinal (resolução de dilatação-volvo gástrico com gastropexia, remoção de corpo estranho), cirurgia ortopédica, cirurgia oftálmica (enucleação), cirurgia reconstrutiva, cirurgia de baço (esplenectomia), cirurgia de fígado (lobectomia parcial), ressecção de tumores, ablação de canal auditivo, mastectomia e cirurgia torácica (resolução de persistência de ducto arterioso).

Adquiri aptidão para aplicar as regras de assépsia no bloco operatório.

Tomei um papel activo na indução da anestesia, incluindo a realização de intubação endotraqueal, e na monitorização anestésica.

Participei activamente nalgumas cirurgias como ajudante cirúrgico, onde aprendi a manusear os tecidos e entrei em maior contacto com a técnica cirúrgica. Tive a oportunidade de realizar duas orquiectomias em cão e uma em gato como primeiro cirurgião.

1.4 Formação

Durante o meu período de estágio foram organizadas duas sessões de formação dirigidas aos enfermeiros do HVA, nas quais me foi permitida a assistência. A primeira sessão intitulada de “Medicina Dentária” foi leccionada pela Dra. Sofia Domingues e teve como objectivo protocolar a consulta de medicina dentária, transmitindo conceitos e técnicas para a identificação de lesões ou alterações e para o aconselhamento sobre prevenção e a destararização aos clientes. A segunda sessão intitulada de “Monitorização Anestésica” foi leccionada pelo Dr. Rui Máximo e transmitiu os conceitos básicos de monitorização dos sinais vitais e profundidade anestésica durante uma anestesia, adaptada ao equipamento e situações médico-cirúrgicas vividas no HVA.

2. Estágio extra-curricular - Hospital Escolar Veterinário – Faculdade de Medicina Veterinária

Desenvolvi um estágio extra-curricular no Hospital Escolar Veterinário (HEV) da Faculdade de Medicina Veterinária (FMV) da Universidade de Lisboa (ULisboa), durante o mês de Março, perfazendo um total de 48 horas. Durante este período acompanhei o serviço de oftalmologia, sob orientação da Professora Esmeralda Delgado.

Assisti às consultas deste serviço de referência, entrando em contacto com casuística muito específica e especializada. Participei nas consultas através da realização do exame oftalmológico, adquirindo prática na interpretação do mesmo, e na administração de medicação.

Assisti a exames de diagnóstico especializados como electrorretinografia e ecografia ocular e às cirurgias realizadas neste período de tempo.

3. Estágio extra-curricular - Queen Mother Hospital for Animals – Royal Veterinary College

Desenvolvi um segundo estágio extra-curricular no *Queen Mother Hospital for Animals* (QMHA) do *Royal Veterinary College* (RVC) da Universidade de Londres de 30 de Abril a

10 de Maio, num total de 88 horas. Durante este período fui integrado no serviço de Oncologia do hospital sob a supervisão da chefe de serviço Dra. Ana Lara.

Durante as duas semanas do estágio tive a oportunidade de conhecer o trabalho realizado num centro de referência com maior capacidade de trabalho e acesso a tecnologias e métodos de diagnóstico e terapêutica ainda pouco desenvolvidos em Portugal.

Acompanhei os casos do serviço de Oncologia, assistindo às consultas, aos tratamentos de quimioterapia e à execução de exames de diagnóstico como tomografia computadorizada, ecografia e citologia e adquiri maior conhecimento da especialidade e do trabalho desenvolvido na mesma. Participei nas rondas médicas com a apresentação dos casos clínicos e na interpretação de citologias.

II - Revisão Bibliográfica – Leptospirose Canina

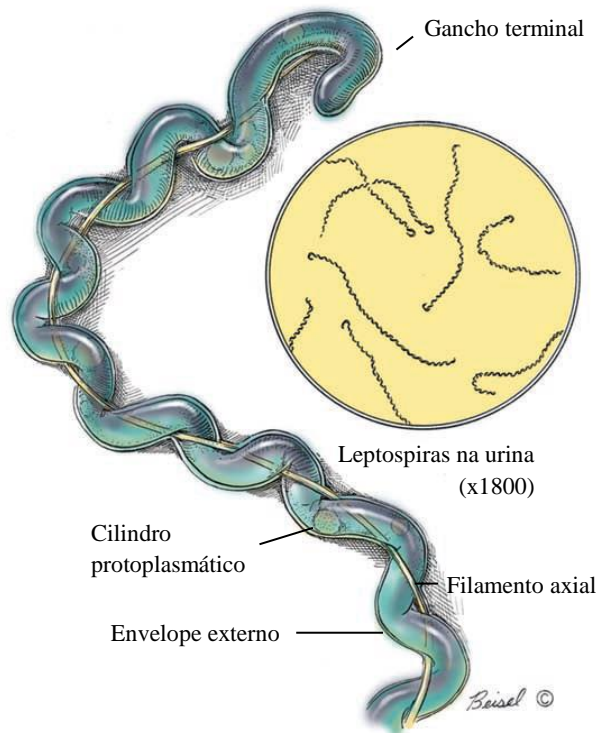
1. Etiologia

A leptospirose é uma doença provocada por espiroquetas da espécie *Leptospira interrogans* e *Leptospira kirshneri* (Sykes, 2014; Sykes et al., 2011). *Leptospira spp.* são bactérias flexíveis, dotadas da capacidade de mobilidade, filamentosas (0,1 a 0,2 µm de largura e 6 a 12 µm de comprimento), em forma de espiral e com terminação em gancho (figura 1) (Greene, 2012; Sykes, 2014). Estes microrganismos são aeróbios obrigatórios, têm uma temperatura óptima de crescimento entre os 28 e os 30°C e produzem catalase e oxidase (Levett, 2001).

A nomenclatura e taxonomia da *Leptospira spp.* tem sofrido evolução que data desde 1989, ano em que foi inicialmente classificada com base em cultura e reactividade imunológica. Classicamente o género *Leptospira* foi dividido em duas espécies, *L. interrogans sensu lato*, na qual se incluem as estirpes patogénicas e *Leptospira biflexa sensu lato*, contendo as estirpes saprófitas (Cerqueira & Picardeau, 2009; Greene, 2012). Dentro destes dois grupos identificam-se diferentes serovares, que se distinguem antigenicamente a partir da heterogeneidade estrutural da membrana externa de lipopolissacáridos (LPS) (Greene, 2012). Através do teste de absorção de aglutinação cruzada (CAAT) foram identificados, aproximadamente, 250 serovars de leptospiros patogénicas (Cerqueira & Picardeau, 2009), agrupando-se em 20 serogrupos relacionados antigenicamente (Greene, 2012; Sykes, 2014), numa lista que é periodicamente actualizada. Os serogrupos, que são identificados através do teste de microaglutinação (MAT), não têm valor taxonómico, mas são úteis para a aplicação prática de agrupar os organismos antigenicamente semelhantes (Cerqueira & Picardeau, 2009). O quadro 1 apresenta uma listagem de serogrupos e alguns serovars de *L. interrogans sensu lato*.

Apesar da relação antigénica entre organismos do mesmo serogrupo ou até do mesmo serovar, a tentativa de relacionar aspectos clínicos pode ser frustrante, uma vez que serovares de diferentes áreas geográficas e que pertencem ao mesmo serogrupo podem ter vastas diferenças na composição genética e patogenicidade e ter diferentes hospedeiros reservatório (Greene, 2012).

Figura 1 – Ultraestrutura das leptospiras patogénicas (Adaptado de Greene, 2012).



Com a emergente evolução de métodos de tipificação molecular, o conceito de “serovar” tem-se revelado cada vez menos satisfatório, dado que falha na definição epidemiológica de estirpes importantes dum forma adequada (Cerqueira & Picardeau, 2009). Recentemente, tem-se recorrido a métodos que utilizam *polimerase chain reaction* (PCR) para amplificar polimorfismos no ácido desoxirribonucleico (ADN) que identificam diferentes estirpes de *Leptospira*, o que permite uma classificação baseada no genótipo. Em comparação com a classificação clássica em serovares, genótipos específicos parecem associar-se de forma mais coerente no que diz respeito a hospedeiros reservatório e manifestação clínica da doença (Sykes, 2014).

Quadro 1 – Serogrupos e alguns serovares de *L. interrogans sensu lato* (Adaptado de Levett, 2001).

Serogrupo	Serovar(es)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Lai, Zimbabwe
Hebdomadis	Hebdomadis, Jules, Kremastos
Autumnalis	Autumnalis, Fortbrag, Bim, Weerasinghe
Pyrogenes	Pyrogenes
Bataviae	Bataviae
Grippotyphosa	Grippotyphosa, Canalzonae, Ratnapura
Canicola	Canicola
Australis	Australis, Bratislava, Lora
Pomona	Pomona
Javanica	Javanica
Sejroe	Sejroe, Saxkoebing, Hardjo
Pamana	Pamana, Mangus
Cynopteri	Cynopteri
Djasiman	Djasiman
Sarmin	Sarmin
Mini	Mini, Georgia
Tarassovi	Tarassovi
Ballum	Ballum, Aroborea
Celledoni	Celledoni
Louisiana	Louisiana, Lanka
Ranarum	Ranarum
Manhao	Manhao
Shermani	Shermani
Hurstbridge	Hurstbridge

2. Epidemiologia

2.1 Factores de risco

As leptospiras são transmitidas entre hospedeiros por contacto directo e menos frequentemente por contacto indirecto. A transmissão directa ocorre através do contacto com urina infectada, contacto venéreo, transferência placentária, ferimentos de mordedura ou ingestão de tecidos infectados, enquanto a transmissão indirecta ocorre através da exposição de animais susceptíveis a águas, solos e alimentos contaminados. (Greene, 2012; Sessions & Greene, 2004a; Sykes, 2014; Sykes et al., 2011).

Águas estagnadas ou correntes lentas de água morna constituem um habitat apropriado para as leptospiras (Greene, 2012; Sessions & Greene, 2004a) que, apesar de desprovidas de capacidade de replicação fora do hospedeiro, podem sobreviver na água e no solo molhado durante meses (Sykes, 2014). O aumento da incidência e surtos da doença em cães têm sido correlacionados com períodos de elevada pluviosidade e cheias (Greene, 2012; Sessions & Greene, 2004a; Sykes, 2014). Do mesmo modo, a proximidade de habitação com cursos de água e locais de inundação frequente é considerada um importante factor de risco (Raghavan, Brenner, Higgins, Hutchinson, & Harkin, 2012a). Surgem mais cães infectados nos meses de Outono, altura em que a temperatura ambiental é óptima para a sobrevivência do microrganismo (Birnbaum et al., 1998; Kikuti, Langoni, Nobrega, Corrêa, & Ullmann, 2012; Raghavan, Brenner, Higgins, Van der Merwe, & Harkin, 2011).

As leptospiras patogénicas são rapidamente inactivadas no ambiente pelo calor excessivo, radiação ultravioleta, desinfectantes e temperaturas de congelação (Greene, 2012; Sykes, 2014).

Embora alguns estudos sugiram um aumento do risco de exposição em cães de trabalho, de raça grande, machos, não castrados e com acesso ao exterior, a doença pode afectar cães de qualquer idade, raça e sexo (Birnbaum et al., 1998; Greene, 2012; Sykes, 2014). Foi demonstrado que a doença pode associar-se com a proximidade de parques públicos, campus universitários e zonas recentemente urbanizadas (Raghavan, Brenner, Higgins, Hutchinson, & Harkin, 2012b). O estatuto de pobreza de uma região também pode ser considerado um factor de risco (Oliveira, Guimarães, Portugal, & Medeiros, 2009; Raghavan, Brenner, Higgins, Hutchinson, & Harkin, 2012b). A leptospirose é uma doença urbana e não apenas rural, provavelmente devido à grande concentração de espécies reservatório urbanas (roedores) e consequente aumento do risco de transmissão (Raghavan et al., 2011).

2.2 Serogrupo e hospedeiros reservatório

Quase todos os mamíferos, distribuídos por todo o mundo, podem ser hospedeiros reservatório de *Leptospira*. As leptospiras patogénicas persistem nos túbulos proximais renais dos rins dos hospedeiros reservatório, que, apesar de não manifestarem sintomatologia, excretam cronicamente leptospiras pela urina. A consequente contaminação dos solos e águas permite a infecção de hospedeiros acidentais, como, por exemplo, o cão que manifesta sintomatologia aguda e não se mantém portador renal da doença se convenientemente tratado (Adler & Peña Moctezuma, 2010).

O cão foi identificado como reservatório natural do serogrupo Canicola, enquanto os roedores são responsáveis pela preservação dos restantes serogrupos, principalmente Icterohaemorrhagiae (André-Fontaine, 2006). No quadro 2 estão representados alguns serovares de *Leptospira interrogans* e *Leptospira kirschneri* que infectam clinicamente o cão e seus potenciais hospedeiros reservatório.

Quadro 2 - Exemplo de serovares de *Leptospira interrogans* e *Leptospira kirschneri* que infectam clinicamente o cão e potenciais hospedeiros reservatório (Adaptado de Sykes, 2014).

Espécie	Serogrupo	Serovar	Potenciais hospedeiros reservatório
<i>Leptospira interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	Rato
	Canicola	Canicola	Canídeo
	Pomona	Pomona	Equino, bovino, leão marinho
	Australis	Bratislava	Ouriço cacheiro, suíno, equino
	Sejroe	ND	Rato
	Ballum	Ballum	Rato, esquilo, rato almiscarado, gambá
<i>Leptospira kirschneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Guaxinim, esquilo, rato almiscarado, lince, ratazana, rato, bovino, equino

2.3 Epidemiologia na Europa

Os principais serogrupos aos quais os cães estão mais expostos na Europa são *Icterohaemorrhagiae*, *Grippotyphosa*, *Australis*, *Sejroe* e *Canicola* (Ellis, 2010).

O serovar *Canicola* é mantido pelo cão, não havendo outro hospedeiro reservatório responsável pela manutenção do agente (Ellis, 2010). A vasta prática vacinal, com vacinas compostas dos serogrupos *Canicola* e *Icterohaemorrhagiae*, determinou uma descida da seroprevalência do serogrupo *Canicola* na Europa, permitindo confirmar a afirmação anterior. Apesar dos produtos de ambas as vacinas serem de igual imunogenicidade, foi observada uma discrepância de seroprevalência de 20% entre o serogrupo *Icterohaemorrhagiae* (76%) e *Canicola* (56%) numa amostra de mais de 2400 animais positivos (André-Fontaine, 2006). Um aumento tão acentuado da seroprevalência do serogrupo *Icterohaemorrhagiae* explica-se, plausivelmente, pela maior pressão de infecção nos cães que se mantém expostos às leptospiras presentes no ambiente e que são disseminadas por outros animais, como os roedores. A diminuição da seroprevalência do serogrupo *Canicola* explica-se, facilmente, se o cão for o reservatório natural do serogrupo e a vasta vacinação destes animais tiver diminuído a disseminação por eles produzida (André-Fontaine, 2006).

É de consenso geral que a seroprevalência para o serovar *Canicola* diminuiu em muitos países europeus; no entanto, ainda existe evidência de exposição serológica na Roménia e Polónia (Ellis, 2010) e casos clínicos ainda são encontrados, por exemplo, na Alemanha (Geisen et al., 2007).

A infecção pelo serogrupo *Icterohaemorrhagiae* é a que sofre menos variação geográfica, dada a ubiquidade do seu hospedeiro reservatório, o rato. Infecções pelos serovares pertencentes a este serogrupo (*Icterohaemorrhagiae* e *Copenhageni*) foram identificadas na Alemanha, Croácia, Dinamarca, França, Roménia, Grécia e Itália (Ellis, 2010).

O serovar *Grippotyphosa* foi identificado como principal agente de leptospirose clínica em cães na Alemanha, seguido do *Sejroe* (Geisen et al., 2007), e em Itália, em conjunto com o serovar *Bratislava* (Scanziani et al., 2002). O mesmo foi identificado em diversos países europeus como República Checa, Polónia, Croácia e Suíça (Ellis, 2010).

Dada a proximidade antigénica e genética entre os quatro serovares actualmente incluídos no serogrupo *Australis* (*Bratislava*, *Lora*, *Jalna* e *Muenchen*), apenas o serovar *Bratislava* tem sido utilizado nos testes MAT para estudos de seroprevalência. Também se acredita que a prevenção para o serovar *Bratislava* produza imunidade para os restantes serovares do serogrupo que também podem infectar o cão. Foi descrita em Itália doença clínica aguda provocada pelo serogrupo *Australis* (Mastrorilli et al., 2007; Scanziani et al., 2002), assim como na Suíça (Major, Schweighauser, & Francey, 2014) e no Reino Unido (Ellis, 2010).

Contrariamente à situação nos Estados Unidos da América, na Europa estudos em cães indicam níveis muito baixos de exposição ao serogrupo Pomona. Podem surgir infecções pelo serovar Mozdok e Pomona, sendo que apenas o segundo foi identificado em cães na Roménia e Bélgica (Ellis, 2010).

Seroprevalências para o serogrupo Sejroe foram referidas nalguns países. Foram identificados os serovares Saxkoebing e Hardjo no Reino Unido; no entanto, existe pouca evidência de difusão da infecção ou de doença clínica e, à semelhança do que se passa com o serogrupo Pomona, não se justifica a sua inclusão na vacinação contra a doença na Europa (Ellis, 2010).

2.4 Epidemiologia em Portugal

Foi realizado um estudo em canídeos na região do Alto Douro no âmbito de uma dissertação de Doutoramento publicada em 1992 (Collares-Pereira, 1992). Este estudo identificou uma seroprevalência de 32,1% de leptospirose canina nesta região do país num total de 868 soros provenientes de 701 canídeos, amostras colhidas em Maio de 1986. Os principais anticorpos identificados no estudo corresponderam aos serovares Canicola (66,2%) e Sejroe (20,0%) e foi também identificada a seroprevalência para os serovares Autumnalis (4,4%), Pyrogenes (3,1%), Grippothyphosa (1,8%), Ballum (1,8%), Copenhageni (0,9%), Bratislava (0,9%), Hebdomadis (0,4%) e Tarassovi (0,4%) (Collares-Pereira, 1992).

Neste mesmo estudo foi observada predominância de seroprevalência nos machos (35,7%) em comparação com as fêmeas (23,1%), provavelmente em virtude do seu comportamento social (Collares-Pereira, 1992).

Foi possível confirmar a existência de uma prevalência importante da leptospirose canina, na região do Alto Douro, sendo que 31,6% dos casos positivos tinham uma titulação elevada no MAT (>1:800). O acentuado número de casos observados com o serogrupo Canicola, numa população rural não vacinada contra esta infecção, demonstrou a sua normal predominância nesta espécie. Além disso, foi identificada uma distribuição semelhante de baixa titulação para o serogrupo Canicola, tanto nos jovens como nos adultos, confirmando a reconhecida adaptação deste serogrupo ao cão, seu reservatório natural. No entanto, o autor reconhece que estes resultados podem não reflectir a verdadeira situação em regiões do país onde a prática vacinal seja habitual (Collares-Pereira, 1992).

Foi realizado um estudo clínico no Distrito de Beja no âmbito de uma dissertação de Mestrado publicada em 2011 (Lança, 2011). O referido estudo referiu o diagnóstico de 9 cães, com recurso a uma titulação de MAT superior a 1:800 e compatibilidade de critérios clínicos e epidemiológicos. O serogrupo Australis (serovar Bratislava) foi identificado como o agente

infectante mais provável em 6 casos, o serogrupo Grippothyphosa foi identificado em 2 e o serogrupo Icterohaemorrhagiae em apenas um (Lança, 2011).

2.5 O gato e o seu papel como hospedeiro reservatório

Apesar da existência de evidência sorológica da exposição de gatos à leptospirose (Greene, 2012; Sykes et al., 2011), a manifestação clínica da doença em gatos é rara. Foram isolados os serovares Canicola, Grippothyphosa e Pomona nesta espécie e a forma de exposição parece estar associada com o contacto com roedores infectados. No entanto, o papel do gato na contaminação ambiental com leptospiras é ainda desconhecido (Sykes et al., 2011).

3. Fisiopatologia e Quadros Clínicos no cão

As leptospiras penetram no organismo através das membranas mucosas da boca, nariz e olhos e da pele através de abrasões e feridas ou após amolecimento por imersão prolongada em água (Greene, 2012; Sykes, 2014). A duração da imersão em água contaminada parece ser um factor preponderante, especialmente se a pele estiver macerada ou se houver exposição da conjuntiva (D. A. Haake et al., 2002). Estas multiplicam-se rapidamente assim que penetram no espaço vascular, progredindo para se replicarem em diversos tecidos incluindo rins, fígado, baço, sistema nervoso central, olhos e aparelho reprodutor. O período de incubação varia consoante as condições da exposição, a virulência do agente e a imunidade do hospedeiro, assim como a manifestação clínica e gravidade da doença, mas alguns estudos demonstraram o aparecimento dos sinais clínicos sete dias após a infecção (Greene, 2012; Sykes, 2014). O período de incubação pode, inclusivamente, ser muito curto, havendo replicação do organismo na corrente sanguínea ao fim de um dia após a infecção, antes de ter ocorrido invasão dos tecidos (Sykes et al., 2011).

3.1 Infecção hiperaguda

Infecções hiperagudas podem surgir por leptospirémia massiva, provocando a morte sem sinais premonitórios. Pode surgir edema tecidular e vasculite nas infecções rápidas e graves que resultam em lesão endotelial e manifestações hemorrágicas. Estas geralmente surgem na forma de síndrome de resposta inflamatória sistémica (SRIS) secundário à sepsis. O LPS leptospiral é o grande responsável pelas alterações inflamatórias e coagulopatias associadas à doença (Greene, 2012), no entanto, há muitos factores de virulência, incluindo adesinas, proteínas de ligação do factor de complemento e hemolisinas, presumidos com base em estudos *in vitro*, que necessitam futura confirmação por testagem em modelos animais (Adler, Lo, Seemann, & Murray, 2011).

3.2 Infecção aguda

Nas infecções agudas, febre (39,5°C a 40°C) acompanhada de tremores, relutância ao exercício e dores musculares, provavelmente resultantes de miosite, são os primeiros sinais clínicos que surgem na fase de leptospirémia (Birnbaum et al., 1998; Geisen et al., 2007; Greene, 2012; Sykes, 2014). Subsequentemente ocorre vômito, desidratação rápida e colapso vascular periférico. Também se observa taquipneia, pulso rápido e irregular e fraca perfusão capilar. Alterações na coagulação e lesão vascular evidenciam-se por hematemesa, hematoquécia, melena, epistáxis e petéquias. Depressão e hipotermia surgem no estadio

terminal da doença. Neste tipo de quadro a insuficiência renal e hepática não têm tempo de se desenvolver (Greene, 2012).

3.3 Quadro renal

A colonização renal é responsável pelos sinais de insuficiência renal aguda característica das infecções subagudas. Esta ocorre devido à replicação e persistência da leptospira nas células epiteliais tubulares, mesmo na presença de anticorpos neutralizantes. A lesão endotelial da pequena vasculatura resulta em lesões isquêmicas do parênquima renal ao qual se junta o aparente efeito citotóxico do LPS leptospiral para a contribuição da lesão renal. Ocorre renomegália secundária, que provoca o decréscimo na filtração glomerular devido à alteração da perfusão renal. Alguns estudos apresentam o papel dos ácidos gordos insaturados de uma fracção glicolípídica das leptospiros na inibição dos canais de sódio-potássio como causa da espoliação de potássio observada em muitos pacientes com leptospirose (Greene, 2012). Podem surgir poliúria, polidipsia, inapetência, vômito e diarreia (Birnbaum et al., 1998; Geisen et al., 2007; Sykes, 2014) e a deterioração progressiva da função renal pode evoluir para oligúria ou anúria (Greene, 2012). No exame físico os rins podem encontrar-se normodimensionados ou aumentados de tamanho e dolorosos à palpação (Greene, 2012).

3.4 Quadro hepático

O fígado é também um órgão alvo da doença, podendo estar presente um quadro de insuficiência hepática na infecção subaguda (Greene, 2012; Sykes, 2014). Pode ocorrer profunda disfunção hepática sem a evidência de grandes alterações histológicas devido à lesão subcelular provocada pelas toxinas da leptospira (Greene, 2012). Alguns componentes do LPS leptospiral, como os ácidos oleico e linoleico, parecem interferir com as bombas de transporte hepáticas e contribuir para a lesão hepática (Burth, Younes-Ibrahim, Santos, Castro-Faria Neto, & de Castro Faria, 2005). A icterícia pode surgir nalguns animais com infecção aguda e, dado que não há ocorrência de hemólise, esta será mais exuberante quanto mais grave for o grau de necrose hepática (Greene, 2012; Sykes, 2014). A colestase intra-hepática pode ser de tal forma completa que a coloração das fezes pode mudar para cinzento. É possível que a lesão hepatocelular e persistência das leptospiros no fígado resultem na alteração da circulação hepática, fibrose e alterações imunológicas que perpetuam uma resposta inflamatória crónica. Esta sequela da leptospirose pode manifestar-se através de inapetência crónica, perda de peso, ascite, icterícia ou encefalopatia hepática (Greene, 2012).

3.5 Quadro gastrointestinal

Sinais gastrointestinais também podem surgir devido a pancreatite e enterite para além da insuficiência renal e hepática, o que pode explicar a apresentação clínica de abdómen agudo e persistência de vômito e anorexia nalguns animais que recuperaram da azotémia após hospitalização (Greene, 2012; Sykes, 2014). Podem surgir invaginações intestinais nas infecções agudas, provavelmente devido à inflamação intestinal (Greene, 2012).

3.6 Quadro pulmonar

Pode surgir lesão pulmonar aguda (Greene, 2012; Klopfleisch et al., 2010; Sykes, 2014). O grau de envolvimento respiratório é, geralmente, reflexo do prognóstico de recuperação da doença e parece existir variação geográfica na prevalência de surtos de hemorragia pulmonar aguda grave associados a leptospirose (Greene, 2012). Trata-se de um achado pouco frequente no cão e a evidência clínica e radiográfica de manifestação pulmonar da leptospirose tem sido raramente descrita (Klopfleisch et al., 2010). Estudos sugerem a existência de um envolvimento pulmonar subclínico comum, baseados em achados radiográficos que demonstram alterações de densidade do interstício pulmonar, compatíveis com a patofisiologia da doença (Birnbaum et al., 1998). No entanto, em Berlim foi registado um aumento crescente do número de animais com a manifestação pulmonar da doença entre 2006 e 2010 semelhante ao síndrome de hemorragia pulmonar leptospiral (LPHS) descrito em Medicina Humana (Klopfleisch et al., 2010). A hemorragia pulmonar aguda parece ocorrer como resultado dos efeitos das toxinas leptospirais sobre o endotélio da vasculatura pulmonar e não com a presença das leptospiros em si no parênquima pulmonar (Greene, 2012; Klopfleisch et al., 2010; Sykes, 2014). Também a vasculite pode contribuir para o desenvolvimento de edema periférico e ligeira efusão pleural e peritoneal (Sykes, 2014). A manifestação clínica de envolvimento pulmonar inclui dispneia e tosse (Greene, 2012).

3.7 Outra sintomatologia

Em cães gravemente afectados podem surgir, embora raramente, manifestações cardíacas evidenciadas à auscultação cardíaca e no electrocardiograma (ECG). Arritmias, nomeadamente taquiarritmias ventriculares, parecem ter origem em lesões do miocárdio (Greene, 2012; Mastroilli et al., 2007; Sykes, 2014). Também o estado urémico pode estar na origem da lesão cardíaca, através de um mecanismo ainda por descrever, tendo sido demonstrado o aumento sérico das troponinas na doença renal (De Zoysa, 2004).

A uveíte é frequente na leptospirose humana e nalguns animais como o cavalo (Greene, 2012) e já foi descrita ocasionalmente no cão (Greene, 2012; Sykes, 2014). Um bom exame oftalmológico pode também revelar conjuntivite e congestão episcleral (Sykes, 2014).

Também sinais de meningite benigna estão pouco descritos no cão, mas serão associados a invasão do sistema nervoso central durante a fase aguda da doença (Greene, 2012).

Problemas reprodutivos, nomeadamente aborto, estão descritos em éguas, vacas e porcas. No entanto, no cão, poucos casos estão descritos (Greene, 2012).

3.8 Quadro clínico e o diagnóstico

Segundo o *Consensus Statement* do Colégio Americano de Medicina Interna Veterinária (ACVIM) sobre a leptospirose, qualquer animal com sinais de insuficiência renal ou hepática, uveíte, hemorragia pulmonar, febre ou aborto deve ser suspeito de leptospirose (Sykes et al., 2011).

Independentemente do serovar infectante, mais de 50% dos cães infectados por leptospirose apresentam letargia (até 100%), anorexia (até 84%) e vômito (até 72%) e mais de 30% apresentam também história de diarreia. Poliúria e polidipsia podem estar presentes até 50% dos casos, fraqueza muscular foi encontrada entre 39% e 52% dos animais e perda de peso entre 17% e 44%. Achados de exame físico comuns incluem dor à palpação abdominal, observável até 36% dos casos, icterícia, que varia entre 10 e 45% e a febre, que não se observa em mais de 36% dos cães. (Birnbaum et al., 1998; Geisen et al., 2007; Goldstein et al., 2006; Kohn et al., 2010). Foram identificados sinais relacionados com o aparelho respiratório entre 62% e 68,8% dos casos em dois estudos recentes em leptospirose canina (Kohn et al., 2010; Major et al., 2014). Num dos estudos 13 dos 31 cães apresentaram dispneia ligeira a moderada, 18 sofreram dispneia grave e 7 desenvolveram hemoptise (Kohn et al., 2010).

3.9 Quadro clínico e o serovar

Têm sido realizadas tentativas de associar serovares a um determinado quadro clínico. Classicamente cães infectados pelos serogrupos Canicola, Bratislava e Grippythosa estão associados a um envolvimento predominantemente renal ou hepático, enquanto os serogrupos Icterohaemorrhagiae e Pomona provocam sobretudo doença hepática (Greene, 2012). Num estudo alemão o serovar Copenhageni (serogrupo Icterohaemorrhagiae) foi associado a possível lesão renal e hepática. Também o serovar Canicola demonstrou associação com lesão renal e/ou hepática evidenciando uma taxa de mortalidade aparentemente mais elevada relativamente às infecções com outros serovares. O serovar Grippythosa associou-se principalmente com doença hepática assim como o serovar Saxkoebing (Geisen et al., 2007). Outro estudo americano identificou a infecção pelo serogrupo Pomona como responsável por um quadro clínico mais grave e com alterações laboratoriais graves, como trombocitopenia, azotemia e hiperfosfatemia, quando comparado com os outros serogrupos identificados no

estudo (Goldstein et al., 2006). No entanto, até à data, não foi criada nenhuma correlação entre o serovar infectante e a manifestação clínica da doença (Geisen et al., 2007; Sykes et al., 2011). Os estudos orientados para a associação de um serogrupo infectante a um determinado quadro clínico têm-se baseado no diagnóstico sorológico, que não é de todo fiável na confirmação do agente etiológico (Goldstein et al., 2006; Greene, 2012; Sykes et al., 2011). Também a ocorrência de transferência lateral de factores de virulência entre serovares dificulta a obtenção de resultados neste tipo de estudos (Sykes et al., 2011). Futuros estudos deverão basear-se na combinação de isolamento, serotipagem e análise genética do agente infeccioso (Greene, 2012; Sykes et al., 2011).

4. Diagnóstico laboratorial

4.1 Hemograma e tempos de coagulação

Os achados hematológicos de um típico caso de leptospirose incluem leucocitose e trombocitopenia. A contagem de leucócitos flutua dependendo do estadio e gravidade da infecção (Greene, 2012). Na fase de leptospirose é comum encontrar-se leucopenia que posteriormente evolui para leucocitose neutrofilica com desvio à esquerda (Greene, 2012; Sykes, 2014). A contagem de leucócitos flutua entre 16.500 e 45.000 cel/ μ L (Greene, 2012) apresentando-se entre 31% e 81% dos animais infectados (Birnbaum et al., 1998; Geisen et al., 2007; Goldstein et al., 2006; Kohn et al., 2010). A trombocitopenia, presente entre 14% e 58% dos animais infectados (Birnbaum et al., 1998; Geisen et al., 2007; Goldstein et al., 2006; Kohn et al., 2010) é geralmente um marcador de mau prognóstico, sendo o seu grau correlacionável com a gravidade do esforço respiratório, alterações na radiografia pulmonar e maior mortalidade (Greene, 2012; Kohn et al., 2010). Outras alterações da coagulação podem-se manifestar como aumento da concentração de fibrinogénio (Sykes, 2014) ou a sua redução (Greene, 2012), tempos de tromboplastina parcial activada e de protrombina prolongados, redução da actividade da antitrombina, aumento da concentração de D-dímeros e aumento de produtos de degradação da fibrina, presumivelmente como resultado de coagulação intravascular disseminada (CID) (Greene, 2012; Sykes, 2014), que pode surgir entre 18,4% e 45% dos casos segundo estudos recentes (Geisen et al., 2007; Major et al., 2014).

Anemia é outro achado frequente no hemograma (Greene, 2012; Sykes, 2014), estando presente em 33% a 53% dos casos (Birnbaum et al., 1998; Geisen et al., 2007; Goldstein et al., 2006; Kohn et al., 2010). Esta é, geralmente, não regenerativa, o que pode reflectir insuficiência renal oligúrica compensada com sobrehidratação, diminuição da produção eritrocitária secundária a doença renal crónica ou perda de sangue aguda (menos de quatro dias) secundária a trombose ou hemorragia pulmonar ou gastrointestinal (Greene, 2012).

4.2 Análises bioquímicas

Mais de 80 a 90% dos cães apresentam, geralmente, azotémia (Birnbaum et al., 1998; Goldstein et al., 2006; Kohn et al., 2010; Sykes, 2014) sendo um achado frequente na apresentação inicial do animal em consulta (Greene, 2012). No entanto, um estudo recente referiu a presença de parâmetros renais aumentados em apenas 57% dos animais infectados (Geisen et al., 2007).

O aumento variável da concentração sérica das enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT, 33 a 78%), aspartato aminotransferase (AST, 39 a 56%) e fosfatase alcalina (FAS, 56 a

90%) e da bilirrubina (17 a 79%) demonstram lesão hepática (Birnbaum et al., 1998; Geisen et al., 2007; Goldstein et al., 2006; Greene, 2012; Kohn et al., 2010; Sykes, 2014). A concentração de bilirrubina pode estar aumentada tanto no soro como na urina e a sua magnitude é, geralmente, proporcional ao grau de disfunção hepática. Marcada bilirrubinúria tende a preceder a hiperbilirrubinémia (Greene, 2012).

Pode surgir hipoalbuminémia em 35% dos casos, provavelmente derivada da proteinúria ou de SRIS e o rácio albumina:globulinas sérico tende a encontrar-se diminuído. Segundo o mesmo estudo, alguns cães podem apresentar hiperglobulinémia em 31% dos casos, o que pode resultar da estimulação antigénica crónica devido a infecção prolongada e/ou desidratação secundária à insuficiência renal (Goldstein et al., 2006; Greene, 2012).

Na maioria dos animais surgem alterações electrolíticas como hiponatrémia, hipoclorémia, hipocalémia e hiperfosfatémia como reflexo do grau de disfunção renal e gastrointestinal (Greene, 2012; Sykes, 2014). Hipercalemia desenvolve-se nos animais oligúricos na insuficiência renal terminal. Ligeira hipocalcémia está associada à hipoalbuminémia. Acidose metabólica surge nos animais gravemente afectados e a hipoglicémia manifesta-se na presença de insuficiência hepática grave (Greene, 2012).

Aumento da amilase e lipase séricas podem surgir por inflamação tecidual hepática e intestinal e por diminuição da sua excreção renal. Aumento da imunoreactividade sérica da lipase pancreática (PLI) é encontrado em animais com aparente pancreatite secundária (Greene, 2012).

Aumento sérico de troponinas cardíacas sugere lesão do miocárdio (Greene, 2012) e aparenta ter relação com o prognóstico da doença (Mastrorilli et al., 2007). Aumento sérico da creatina quinase (CK) surge na ocorrência da inflamação do músculo esquelético (Greene, 2012).

4.3 Urianálise

São achados frequentes de urianálise a isostenúria (44%), ocasionalmente hipostenúria, glicosúria (9 a 82%), proteinúria (28 a 76%), piúria (17 a 27%), cilindrúria (24 a 34%), hematúria microscópica (27 a 71%) e bilirrubinúria (Birnbaum et al., 1998; Geisen et al., 2007; Goldstein et al., 2006; Greene, 2012; Kohn et al., 2010; Sykes, 2014). Alguns animais apresentam aumento do rácio proteína:creatinina urinárias (rácio UPC, 94% num estudo) e proteínas de baixa osmolaridade na urina, indicando uma perda por via tubular ao invés de glomerular das mesmas (Greene, 2012; Kohn et al., 2010; Sykes, 2014).

5. Diagnóstico imagiológico

5.1 Sinais radiológicos

Muitos cães manifestam alterações visíveis na radiografia torácica, apesar da inconsistência do aparecimento de sinais como a tosse e a dispneia (Greene, 2012; Klopfleisch et al., 2010; Kohn et al., 2010; Sykes, 2014). Um aumento marcado da densidade intersticial (nodular a difusa) e padrão alveolar surgem em cães com hemorragia pulmonar (Greene, 2012; Klopfleisch et al., 2010; Sykes, 2014), sendo as lesões mais frequentemente nos lobos dorso-caudais do pulmão (figura 2) (Greene, 2012). Menos frequentemente surge ligeira efusão pleural (Sykes, 2014).

Num estudo recente, que avaliou a prevalência de manifestações pulmonares da doença em 50 cães, 70% dos animais manifestaram padrão pulmonar alterado na radiografia torácica (Kohn et al., 2010). As alterações observadas consistiram em padrão intersticial caudal, ligeiro a moderado padrão intersticial reticulo-nodular generalizado e grave padrão intersticial reticulo-nodular generalizado com consolidações alveolares. Desses cães, 4 não apresentavam sinais clínicos de afecção pulmonar. Dos animais submetidos a eutanásia, pelo grave compromisso respiratório, a necrópsia revelou a presença de grave hemorragia pulmonar aguda difusa (Kohn et al., 2010).

Figura 2 – Imagem radiográfica, evidenciando padrão alveolar/intersticial difuso, de um cão com leptospirose que morreu posteriormente com hemorragia pulmonar (gentilmente cedido por HVA).

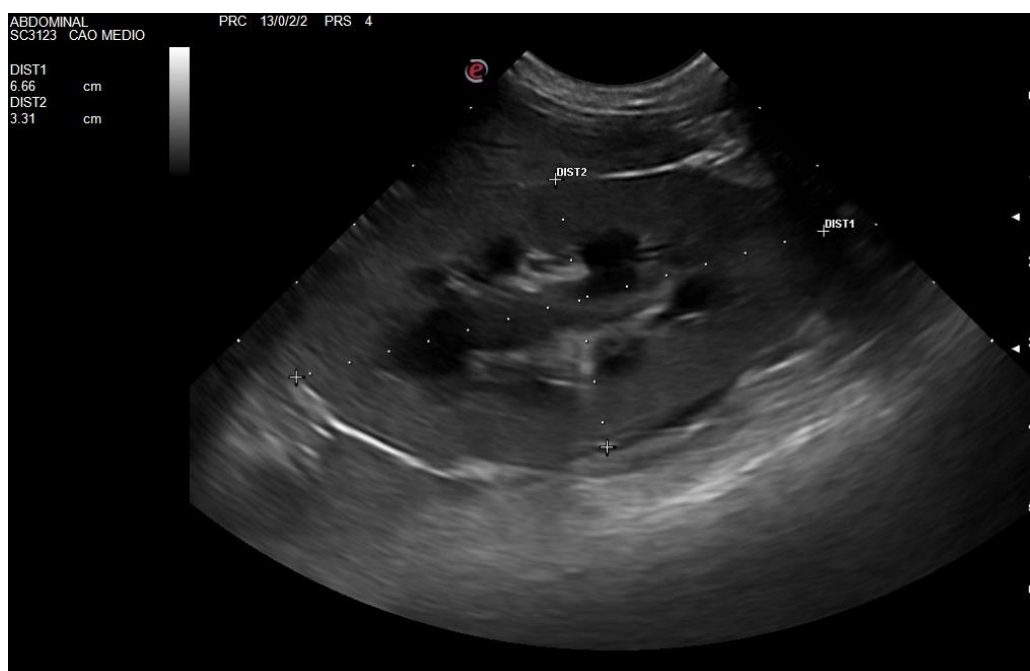


5.2 Sinais ecográficos

Na ecografia abdominal podem-se apreciar algumas alterações renais não específicas como renomegália, aumento da ecogenicidade do córtex renal e ligeira pielectasia (figura 3). Pode estar presente ligeira efusão perirenal e encontrar-se visível uma banda medular de ecogenicidade aumentada (*Medullary Rim Sign*), associada histologicamente com hemorragia, congestão, edema e necrose (Forrest et al., 1998; Greene, 2012; Matoon & Nyland, 2015) não sendo, no entanto, nenhum destes sinais específico de leptospirose em cães (Greene, 2012; Sykes, 2014).

Ainda na ecografia abdominal, podem surgir alterações sugestivas de pancreatite (Greene, 2012; Sykes, 2014), como o aumento do tamanho e hipoeogenicidade do pâncreas (Sykes, 2014). Pode ainda ser visível espessamento da parede gástrica e, menos frequentemente, da parede intestinal, assim como hepatomegália e esplenomegália ligeira a moderada (Sykes, 2014).

Figura 3 – Imagem ecográfica renal de um cão com leptospirose, apresentando renomegália e hiperecogenicidade do córtex renal e ligeira efusão perirenal (gentilmente cedido por Dr. Rui Lemos Ferreira).



6. Diagnóstico Sorológico

6.1 Teste de aglutinação microscópica

O teste de aglutinação microscópica (MAT) é o método de eleição para o diagnóstico sorológico da leptospirose. Este teste produz-se a partir de diferentes meios contendo organismos vivos, representantes de vários serogrupos, que são expostos a diversas diluições do soro do animal em estudo (Greene, 2012; Sykes, 2014; Sykes et al., 2011). O teste requer um microscópio de fundo escuro e o resultado é representado pela maior diluição de soro que provocou a aglutinação de 50% dos organismos. Trata-se, portanto, de um ensaio específico para cada serogrupo, mas que não discrimina organismos do mesmo serovar, devido à existência de reacções imunológicas cruzadas entre as proteínas da membrana externa das diferentes leptospiras (Greene, 2012; Sykes et al., 2011).

É geralmente apresentado ao Médico Veterinário o relatório laboratorial listando as leptospiras que foram utilizadas como antigénio e as titulações de anticorpos que estas revelaram (Greene, 2012).

Na análise do soro proveniente de um cão é frequente observarem titulações positivas (acima de 1:100) para mais do que um serogrupo incluído no teste. Este fenómeno resulta da reacção cruzada entre o soro do animal e os vários organismos utilizados no ensaio, correspondentes a cada serogrupo. Como tal, considera-se a titulação mais elevada a pertencente ao serogrupo infectante (Greene, 2012), apesar de esta não prever, necessariamente, o serovar infectante (Levett, 2003). Quando existem titulações iguais ou superiores a 1:3200 para mais do que um serovar, a correspondente reacção provocada pelo serogrupo é classificada como “mista” e resulta da partilha de epítomos entre organismos do mesmo grupo (Greene, 2012).

Alguns laboratórios testam até sete ou mais serogrupos, incluindo, Autumnalis, Bratislava, Canicola, Grippothyphosa, Sejroe, Icteroharmorrhagiae e Pomona. No entanto os serogrupos a incluir em cada ensaio devem variar consoante a localização geográfica (Greene, 2012), considerando os serogrupos circulantes nas populações caninas, embora essa informação nem sempre esteja disponível (Sykes, 2014; Sykes et al., 2011). Podem surgir falsos negativos se o organismo do serogrupo infectante não estiver presente entre os antigénios escolhidos para a testagem, ou se houver baixa afinidade deste com os organismos escolhidos para representar os diferentes serogrupos (Greene, 2012; Sykes, 2014).

Para a correcta interpretação dos resultados do MAT é importante conhecer a exposição basal da população em estudo. A magnitude esperada para uma titulação positiva depende desse conhecimento. Para cada localização geográfica, a medição da titulação de anticorpos relativa

aos diferentes serogrupos, em animais clinicamente saudáveis ou que sofrem de diferentes doenças, ajuda na caracterização da exposição basal dessa população (Greene, 2012).

As titulações vacinais e as resultantes de infecções prévias podem dificultar a interpretação dos resultados, no entanto estas tendem a ser inferiores a 1:800, apesar de resultados até 1:3200 terem sido observados (Greene, 2012). As titulações tendem a decair quatro meses após a vacinação, mas persistem durante pelo menos um ano nas infecções naturais (Sykes, 2014; Sykes et al., 2011).

Os cães naturalmente infectados apresentam titulações iguais ou superiores a 1:800, o que é presuntivo de leptospirose se for acompanhado de sinais clínicos compatíveis e não houver conhecimento de vacinação recente (últimos quatro meses) (Greene, 2012). No entanto, uma única titulação, mesmo que superior a 1:800, não confirma o diagnóstico de leptospirose (Sykes et al., 2011).

Apesar do evidente acréscimo nos custos, a realização de sucessivas titulações de seguimento ajuda a melhorar a sensibilidade e especificidade dos resultados obtidos no MAT (Greene, 2012). Na primeira semana de infecção, os cães têm frequentemente resultados de MAT negativos. Como tal, as titulações na fase de convalescença para o diagnóstico de infecções agudas devem realizar-se duas a quatro semanas após a titulação inicial, apesar de poder ocorrer seroconversão nos primeiros três a cinco dias após a apresentação do animal no Médico Veterinário (Sykes et al., 2011). As titulações seguintes devem intervalar-se por mais de uma semana e a utilização do mesmo laboratório é crucial para a correcta interpretação dos resultados (Sykes, 2014). A demonstração de um aumento da titulação de anticorpos no MAT para o quádruplo no espaço de três semanas é, classicamente, necessária para o diagnóstico sorológico definitivo de uma infecção aguda por leptospirose, potencialmente auto limitante. Do mesmo modo, um decréscimo da titulação da mesma magnitude, no curso mais avançado da doença, confirma o diagnóstico da doença (Greene, 2012; Sykes, 2014; Sykes et al., 2011). Estão associadas ao MAT algumas limitações. Foi demonstrado que a identidade prevista pelo teste do serogrupo infectante, em cães, varia ao longo do curso da infecção. Sabe-se que a vacinação prévia pode influenciar o padrão de reactividade a cada serovar e também o serogrupo que evidencia maior titulação no MAT varia consoante o laboratório que o realiza. Os resultados do MAT não são, por isso, recomendados para a previsão de serogrupos circulantes numa população de cães. São preferíveis ensaios envolvendo o isolamento da leptospira para o estudo epidemiológico da doença e para a selecção de antigénios no desenho de agentes vacinais (Sykes et al., 2011).

O início precoce de uma terapêutica antimicrobiana pode ser responsável pelo decréscimo na magnitude da titulação, disfarçando o notável aumento provocado pelas infecções agudas recentes, dificultando o seu diagnóstico (Greene, 2012; Sykes, 2014; Sykes et al., 2011).

É também importante salientar que a magnitude da titulação inicial, ou as alterações nas titulações posteriores, não se relacionam, de nenhuma maneira, com a gravidade da doença clínica (Greene, 2012).

O MAT é um teste de diagnóstico bastante acessível e relativamente pouco dispendioso, mas complexo de realizar e de interpretar (Sykes, 2014; Sykes et al., 2011).

Em Portugal o Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV) realiza o teste de MAT para a pesquisa de anticorpos leptospirais. O preço tabelado para a realização do teste é de 8 euros e o tempo de resposta é aproximadamente três dias úteis (Deliberação n.º 607/2015 de 23 de Abril).

6.2 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Têm sido realizados ensaios de ELISA em cães para a detecção de anticorpos leptospirais IgG e IgM. Nestes ensaios é utilizado o LipL32 como antigénio, uma proteína consistentemente presente nos serovares patogénicos de *Leptospira* (Dey et al., 2004; Haake et al., 2000).

Apesar de ambas as classes de anticorpos serem capazes de produzir aglutinação, o aumento de titulação no MAT corresponde, mais aproximadamente, a aumentos da titulação de IgM no ELISA, em lugar de IgG (Greene, 2012).

Em estudos experimentais, a titulação de IgM aumenta a partir de uma semana após infecção, atingindo o pico dentro de duas semanas, a partir das quais começa a diminuir. O aumento da titulação de IgG desenvolve-se duas a três semanas após a infecção, com a titulação máxima ao final de um mês, aproximadamente (Greene, 2012). De forma geral, estudos têm demonstrado que os ensaios de ELISA detectam anticorpos anti-*Leptospira* mais precocemente que o MAT, no entanto anticorpos IgM não são detectados até quatro a cinco dias após o início dos sinais clínicos (Picardeau et al., 2014).

Ao contrário das titulações obtidas no MAT e das titulações de IgM, as titulações de IgG aumentam drasticamente após a vacinação e são capazes de persistir por vários meses. O teste de ELISA demonstra elevadas titulações de IgG em cães repetidamente vacinados, mantendo sempre baixa titulação de IgM, mesmo durante a primeira semana pós vacinação. Desta forma, com a medição combinada de IgG e IgM, o ELISA é mais apropriado para distinguir a infecção natural da imunidade produzida pela vacinação do que o MAT (Greene, 2012).

O MAT é considerado superior em relação a sensibilidade e especificidade comparativamente ao ELISA (Greene, 2012), como tal, a utilização de ensaios ELISA sem o recurso a testes

adicionais não é recomendado para um correcto diagnóstico (Greene, 2012; Picardeau et al., 2014). Por outro lado, o teste ELISA tem especificidade muito baixa para identificação de serovares (Greene, 2012).

6.3 Outros imunoensaios

Outros imunoensaios incluem a imunofluorescência que utiliza anticorpos conjugados a fluorocromos na detecção de anticorpos específicos nos fluídos corporais ou na detecção de antígenos em secções de tecido. A sensibilidade e especificidade da imunofluorescência são semelhantes ao ELISA. Uma vez que requer a utilização de um microscópio de fluorescência, este método não está comercialmente disponível (Picardeau et al., 2014).

A macroaglutinação foi, também, desenvolvida para a produção de um teste rápido de diagnóstico de leptospirose. São utilizadas suspensões de serovares de leptospiros inactivadas para produção de aglutinação macroscópica, visível a olho nu. À semelhança do MAT, o antígeno deve consistir dos serovares mais prevalentes, no entanto trata-se de um teste relativamente insensível para o diagnóstico da doença (Picardeau et al., 2014).

Também com o objectivo de criar um teste de diagnóstico rápido desta doença, foi desenvolvido o ensaio de hemaglutinação indirecta (IHA) que utiliza eritrócitos sensibilizados por uma substância obtida a partir do serovar Patoc de *Leptospira biflexa*, produzindo hemaglutinação, visível a olho nu, quando na presença de soro de um animal infectado. O IHA detecta IgG e IgM, no entanto a sensibilidade varia muito consoante os estudos existentes (Picardeau et al., 2014).

7. Diagnóstico bacteriológico e molecular

7.1 Cultura bacteriana

A cultura bacteriana de leptospiros não é utilizada de forma rotineira (Greene, 2012). A multiplicação das leptospiros é lenta, o tempo de incubação das amostras dura em média 21 dias (Wuthiekanun et al., 2007), podendo durar até seis meses para a confirmação de um resultado negativo, o que torna a cultura bacteriana imprópria para um diagnóstico precoce de leptospirose (Sykes, 2014; Sykes et al., 2011). Adicionalmente este meio de diagnóstico implica o contacto com laboratórios especializados e o resultado requer uma interpretação cuidada, uma vez que se podem isolar leptospiros de animais clinicamente saudáveis (Greene, 2012).

Os cães apresentam leptospirose na primeira semana de infecção, a partir da qual o número de organismos circulantes começa a diminuir com o aumento da titulação de anticorpos. Deste modo, o sangue é o produto ideal para cultura nos dez primeiros dias de infecção. Depois desse período são preferíveis amostras de urina (Greene, 2012; Sykes et al., 2011). Uma vez que se pode desconhecer o momento exacto da infecção, a submissão de ambas as amostras de sangue e urina pode aumentar a probabilidade de obter um resultado positivo (Sykes, 2014; Sykes et al., 2011), preferencialmente antes de iniciar tratamento antimicrobiano (Greene, 2012; Sykes, 2014; Sykes et al., 2011). As amostras devem seguir para laboratório mantidas em meio de transporte em gelo, mas nunca congeladas (Greene, 2012).

7.2 Microscopia de fundo escuro

Em teoria a leptospirose pode ser diagnosticada por microscopia de fundo escuro do sangue, durante a primeira semana de infecção (Picardeau et al., 2014). É necessário recorrer a um microscópio de fundo escuro para o exame directo das leptospiros porque estas não coram pelos métodos tradicionais (Greene, 2012). Também o exame do sedimento urinário através de microscopia de fundo escuro é possível mas este é um método muito insensível para o diagnóstico da doença (Sykes, 2014). O limite para a detecção foi determinado como 10^4 leptospiros por mililitro de sangue ou urina (Picardeau et al., 2014).

Podem surgir muitos artefactos que se assemelhem com as leptospiros e apesar de se tratar de um exame pouco dispendioso, o microscópio de fundo escuro raramente se encontra disponível, sendo a sua aquisição demasiado dispendiosa para a maioria das instalações (Picardeau et al., 2014). Devido à sua imprecisão, este exame já não é recomendado (Greene, 2012).

7.3 Imunodeteção

Alguns procedimentos de imunohistoquímica que foram desenvolvidos para a detecção de leptospiras em tecidos caninos, nomeadamente no tecido renal, têm-se demonstrado eficazes no diagnóstico da doença. Podem ser utilizadas amostras fixas em formol e a técnica demonstrou elevada especificidade (Greene, 2012), mas não permite a identificação do serovar infectante uma vez que os anticorpos utilizados na técnica reagem com múltiplos serovares de leptospira (Ross, Jakowski, Bolin, & Kiupel, 2011). O historial de prévia vacinação não tem por que interferir com o diagnóstico de leptospirose através de imunohistoquímica. Não é de esperar encontrar-se antigénio vacinal no tecido renal, visto utilizarem-se apenas vacinas inactivadas cujo antigénio permanece sobretudo no tecido subcutâneo, local de administração (Ross et al., 2011).

O diagnóstico com recurso a imunohistoquímica aparenta ter a mesma sensibilidade e especificidade que a técnica de impregnação com nitrato de prata do tecido renal (método de Levaditti), no entanto, a primeira aumenta a qualidade do exame histológico, facilitando o diagnóstico e permitindo uma melhor avaliação da morfologia dos tecidos (Wild et al., 2002).

7.4 Detecção genética

Os ensaios de *polymerase chain reaction* (PCR) são realizados por diversos laboratórios para a detecção de ADN de leptospiras patogénicas (Sykes, 2014). Estes ensaios pesquisam genes presentes apenas nas leptospiras patogénicas como *secY*, *lfb1*, *lipL32* e *lig* (Xu et al., 2014). Consegue-se a rápida distinção entre leptospiras patogénicas e não patogénicas, mas ainda não foi desenvolvido nenhum ensaio de PCR fiável para a distinção entre serovares e serogrupos (Greene, 2012; Picardeau et al., 2014; Sykes et al., 2011).

Como na cultura bacteriana, ambas as amostras de sangue (ou plasma anticoagulado) e urina devem ser submetidas para análise, dado que o momento preciso da infecção é difícil de precisar, e de preferência antes de iniciar qualquer terapêutica antimicrobiana (Greene, 2012; Sykes, 2014). O limite de detecção dos ensaios de PCR foi determinado entre 100 e 1000 bactérias por mililitro de sangue ou urina (Picardeau et al., 2014)

Os ensaios de PCR têm a potencial vantagem de permitir o diagnóstico no curso precoce da doença, quando os testes sorológicos ainda são negativos (Sykes, 2014; Sykes et al., 2011). Podem surgir resultados falsos positivos. Alguns ensaios detectam serovares não patogénicos e todos podem detectar organismos latentes em portadores subclínicos. Os resultados falsos negativos ocorrem quando o momento da colheita da amostra não corresponde ao momento de maior concentração do microrganismo nesse fluido corporal, quando existem poucos

microrganismos devido à presença de agentes inibitórios (especialmente na urina) e quando a extracção de ADN é insuficiente para um ensaio correcto (Greene, 2012).

A vacinação de cães saudáveis com vacinas inactivadas de *Leptospira* não tem razão para produzir um resultado positivo no PCR, como tal, o historial de vacinação não interfere com o diagnóstico de leptospirose por PCR (Midence, Leutenegger, Chandler, & Goldstein, 2012; Sykes, 2014; Sykes et al., 2011).

Com o objectivo de determinar a sensibilidade e especificidade dos métodos de PCR no diagnóstico clínico de leptospirose, serão necessários mais estudos no futuro (Greene, 2012; Sykes, 2014; Sykes et al., 2011). No entanto, um resultado de PCR positivo no sangue ou urina de um animal com sinais clínicos consistentes com a doença corrobora fortemente o diagnóstico (Greene, 2012).

Actualmente, como alternativa aos métodos baseados em PCR, surgiram os métodos de amplificação isotérmica de ADN como o *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP). Os ensaios baseados no LAMP foram desenvolvidos para a rápida detecção de leptospirosas patogénicas, com uma especificidade moderada a baixa e com limite de detecção de 2 a 100 leptospirosas por mistura de reacção. No entanto, mais estudos são, ainda, necessários para a avaliação da verdadeira utilidade destes meios de diagnóstico (Picardeau et al., 2014).

8. Anatomia Patológica

8.1 Achados macroscópicos

No exame anatomopatológico as membranas mucosas encontram-se congestionadas e ictéricas com hemorragias petequiais e equimoses (Greene, 2012; Sykes, 2014). Para além das mucosas, sinais de hemorragia surgem noutros órgãos, como petéquias e sufusões e, mais ocasionalmente, hemorragias cavitárias, na forma de hemotórax, hemoperitoneu e hemopericárdio (Tochetto, Flores, Kommers, Barros, & Fighera, 2012).

Nos casos de doença aguda, os rins podem estar ligeiramente aumentados de tamanho e pálidos (Greene, 2012; Sykes, 2014; Tochetto et al., 2012). Por vezes, os rins apresentam petéquias (Sykes, 2014) e observam-se hemorragias na superfície capsular (Tochetto et al., 2012), mas hemorragias subcapsulares são comuns (figura 4) (Greene, 2012). Em casos mais crónicos os rins podem-se encontrar diminuídos de tamanho, com superfície irregular (figura 5) (Greene, 2012; Sykes, 2014).

Figura 4 – A, Intensa coloração amarela da cortical num rim de cão com leptospirose. B, Hemorragias multifocais num rim amarelo pálido de um cão com leptospirose (gentilmente cedido por Dr. Rafael Fighera).

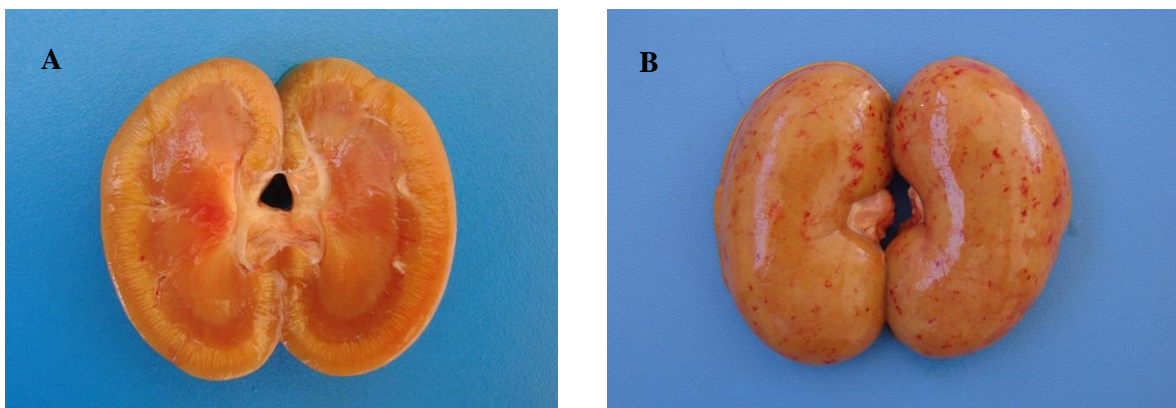
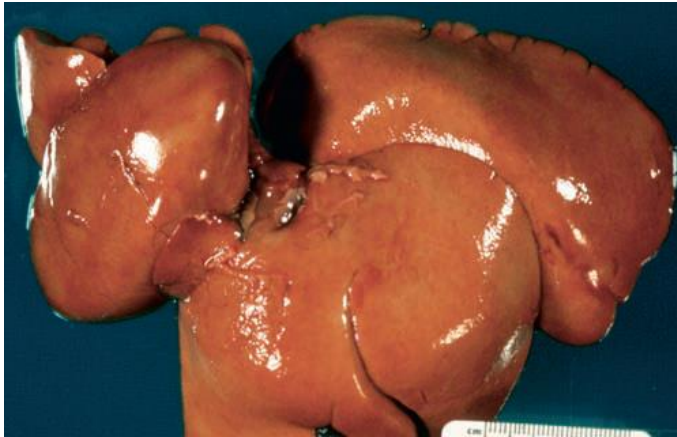


Figura 5 – Rins retraídos e fibróticos de um cão diagnosticado previamente com leptospirose (há 5 meses) O cão tinha sido tratado, encontrando-se saudável na altura da morte por um acidente rodoviário (Greene, 2012).



Alterações macroscópicas do fígado surgem quando existe envolvimento hepático da doença, tais como mudança de cor, para um tom mais pálido, acentuação do padrão lobular e aumento difuso do tamanho (figura 6) (Greene, 2012; Tochetto et al., 2012). Alguns casos revelam, também, hemorragias na vesícula biliar (Tochetto et al., 2012).

Figura 6 – Fígado aumentado de volume e necrótico de um cão com leptospirose aguda (Greene, 2012).



O edema pulmonar é um achado comum, muitas vezes acompanhado por congestão e/ou hemorragia, ficando os pulmões pesados, com aspecto húmido e brilhante (figura 7) (Greene, 2012; Klopfleisch et al., 2010; Tochetto et al., 2012). Lesões petequiais são particularmente comuns na superfície subpleural (Greene, 2012).

Figura 7 – Lesões de hemorragia pulmonar de um cão com leptospirose (gentilmente cedido por Dr. Rafael Figuera).



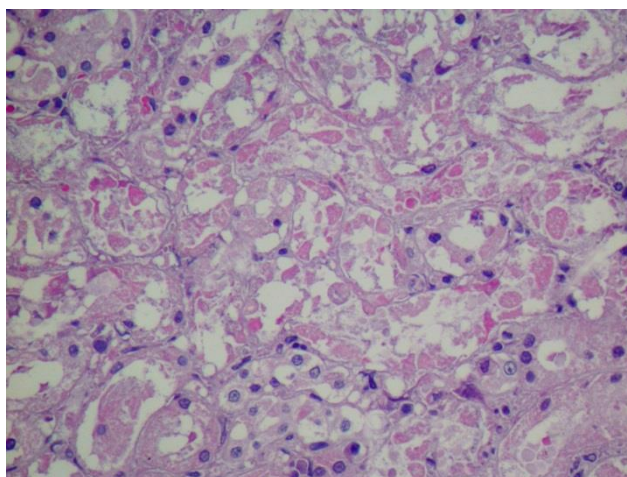
Podem encontrar-se lesões de urémia sob a forma de ulceração focal na cavidade bucal e língua, ulceração gástrica e intestinal (Greene, 2012; Tochetto et al., 2012), endocardite mural ulcerativa, mineralização da pleura parietal, mineralização da íntima da artéria aorta e hiperplasia difusa das glândulas paratiróides (Tochetto et al., 2012).

Outros achados menos comuns incluem linfadenomegália generalizada, tonsilomegália e invaginações intestinais (Greene, 2012; Tochetto et al., 2012).

8.2 Achados histológicos

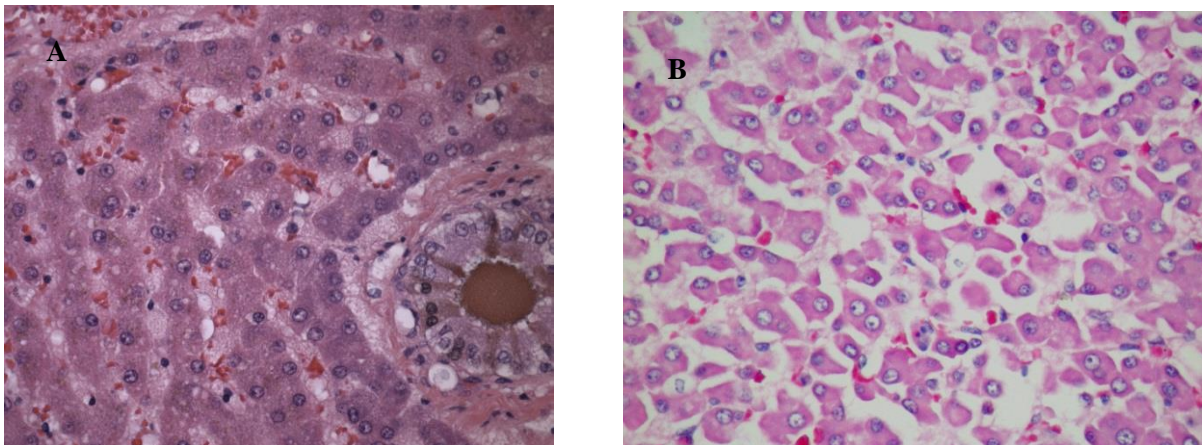
Observam-se várias alterações histológicas nos rins, dependendo da virulência do serovar infectante e duração da infecção (Greene, 2012). Nos casos agudos e subagudos de leptospirose encontram-se lesões de degeneração e necrose do epitélio tubular (nefrose tubular) (figura 8). Pequenas quantidades de células necróticas e cilindros hialinos ou granulares também se observam, podendo ser a causa de obstrução tubular nos casos mais graves (Tochetto et al., 2012). Algum grau de nefrite intersticial também pode surgir, esta é constituída principalmente por linfócitos e plasmócitos, mas também por macrófagos e raros neutrófilos, principalmente na junção corticomedular (Greene, 2012; Tochetto et al., 2012). Os rins cronicamente afectados caracterizam-se principalmente por fibrose intersticial difusa, com alguma ligeira a moderada inflamação linfoplasmocítica multifocal e esparsos macrófagos. Estas alterações histológicas não são específicas de leptospirose crónica e surgem na maioria dos rins em estado final de função (Greene, 2012). Outras lesões renais, menos frequentes, surgem como mineralização, necrose fibrinóide vascular (Greene, 2012; Tochetto et al., 2012), ectasia tubular, aglomerados de neutrófilos, cristais e pigmento biliar intra-tubulares e regeneração tubular. Glomerulonefrite membranoproliferativa e nefrite embólica são observadas apenas ocasionalmente (Tochetto et al., 2012).

Figura 8 – Lesões renais na leptospirose canina. Acentuada degeneração e necrose das células epiteliais tubulares no rim, H&E, 200x (gentilmente cedido por Dr. Rafael Figuera).



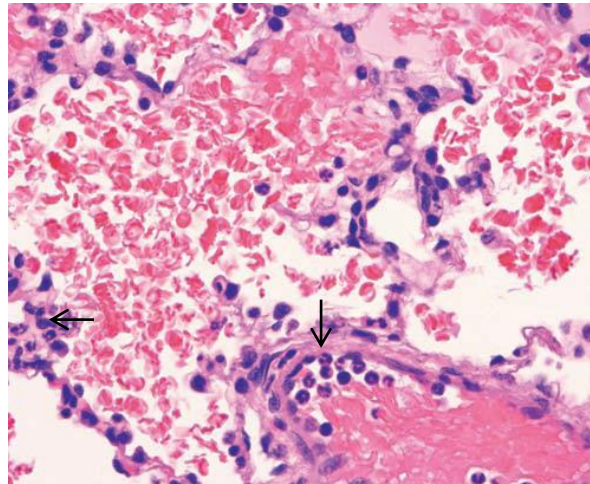
No fígado as lesões provocadas pela leptospirose surgem, principalmente, por dissociação dos cordões de hepatócitos e acumulação de pigmento biliar (Tochetto et al., 2012). Pode observar-se, como tal, estase biliar intra-hepática (Greene, 2012) e focos de necrose do parênquima (Greene, 2012; Tochetto et al., 2012). Hipertrofia das células de Kupffer, associada à eritrofagocitose foi também descrita, assim como degenerescência vacuolar dos hepatócitos, neutrófilos no interior dos sinusóides, infiltração inflamatória mononuclear nos espaços porta e no parênquima e aumento do número de hepatócitos binucleados e em mitose (figura 9) (Tochetto et al., 2012). Nas infecções crónicas podem-se encontrar sinais de hepatite crónica activa e fibrose hepática (Greene, 2012).

Figura 9 –A, Alterações hepáticas mínimas e colestase grave num cão com leptospirose anúrica. As concentrações séricas da FAS e da bilirrubina total apresentavam-se ligeiramente aumentadas (Sykes, 2014). B, Acentuada dissociação dos cordões de hepatócitos num fígado com número aumentado de hepatócitos binucleados, na leptospirose canina. H&E, 200x (gentilmente cedido por Dr. Rafael Fighera).



O exame anatomopatológico de animais com quadro pulmonar assemelha-se ao descrito na leptospirose em Medicina Humana, surgindo edema e hemorragia alveolares como lesões mais prevalentes (figura 10) (Sykes, 2014; Tochetto et al., 2012). Acompanham o edema filamentos e coágulos de fibrina, encontrando-se, também frequentemente, neutrófilos e macrófagos nos espaços alveolares. As lesões caracterizam, principalmente, processos agudos, ocorrendo, também, ocasionalmente, capilarite, hiperplasia dos pneumócitos tipo II (Tochetto et al., 2012) e formação de membranas hialinas (Sykes, 2014; Tochetto et al., 2012). Sinais de pneumopatia urémica, como a presença de neutrófilos e pequena quantidade de fibrina ao redor de septos alveolares mineralizados, também podem ser observados (Tochetto et al., 2012).

Figura 10 – Hemorragia pulmonar aguda num cão com leptospirose aguda. Os alvéolos contêm eritrócitos livres em grande número. Presença de neutrófilos marginalizados no interior dos vasos sanguíneos (setas). Coloração H&E, 400x. (Greene, 2012).



Achados de lesão neurológica podem surgir na forma de hemorragia perivascular, infiltração celular mononuclear e, ocasionalmente, trombose vascular (Greene, 2012). Miocardite neutrofílica e necrosante pode também ocorrer e mionecrose do músculo esquelético foi, também, ocasionalmente, descrita (Sykes, 2014).

9. Terapêutica

9.1 Antibioterapia

O tratamento antimicrobiano deve ser iniciado imediatamente, face à suspeita de leptospirose, mesmo antes da confirmação laboratorial do diagnóstico (Greene, 2012; Sykes, 2014; Sykes et al., 2011). Os antibióticos reduzem a febre e a leptospirémia poucas horas após o início da sua administração e inibem imediatamente a multiplicação do organismo, reduzindo rapidamente a ocorrência de complicações associadas à infecção (Greene, 2012).

O tratamento ideal para a leptospirose é ainda desconhecido (Sykes et al., 2011). Com base na bibliografia mais recente, o *Consensus Statement* do Colégio Americano de Medicina Interna Veterinária (ACVIM) sobre a leptospirose recomenda o tratamento da leptospirose canina com doxiciclina a 5 mg/Kg PO ou IV, cada 12 horas, por duas semanas (Sykes et al., 2011). A doxiciclina demonstrou-se eficaz na eliminação das leptospiros do sangue, rim e fígado no espaço de três dias após início do tratamento (Truccolo, Charavay, Merien, & Perolat, 2002), sendo um fármaco de eleição no tratamento da leptospirose humana (Suputtamongkol et al., 2010).

Nos animais urémicos, que não toleram a medicação oral devido ao vômito, ou com comprometimento da função hepática pode ser administradas inicialmente ampicilina a 20 mg/Kg IV, a cada 6 horas (com redução da dose nos animais azotémicos) ou penicilina G na dose de 25000 a 40000 U/kg IV a cada 12 horas (Greene, 2012; Sykes, 2014; Sykes et al., 2011). A penicilina e os seus derivados são considerados os antibióticos de eleição para a eliminação da leptospirémia, mas não eliminam eficazmente o estado de portador renal (Greene, 2012; Truccolo et al., 2002; Watt et al., 1988), sendo, por isso, recomendada a utilização da doxiciclina assim que o animal tolerar a medicação oral. O tratamento com doxiciclina oral deve durar até duas semanas após a resolução dos sinais gastrointestinais (Sykes, 2014; Sykes et al., 2011). A ampicilina não deve ser administrada por via oral porque não tem boa absorção intestinal e a sua biodisponibilidade reduz significativamente com a presença de comida (Greene, 2012; Ramsey, 2014; Sykes et al., 2011).

Outros antibióticos revelaram-se eficazes contra a leptospirose em Medicina Humana como a ceftriaxona (Panaphut, Domrongkitchaiporn, Vibhagool, Thinkamrop, & SUSAENGRAT, 2003), azitromicina (Phimda et al., 2007) e cefotaxima (Sykes et al., 2011). Os aminoglicosídeos, embora altamente eficazes na eliminação das leptospiros dos rins, não podem ser administrados até os parâmetros renais se encontrarem no intervalo de referência (Greene, 2012).

9.2 Terapia de suporte

A desidratação e o choque ocorrem nos animais gravemente afectados. É importante a introdução de um cateter venoso, de preferência numa veia central, para administração de grande volume de fluídos e monitorização da pressão arterial central (Greene, 2012). A reposição da volémia requer administração intravenosa agressiva de cristalóides, calculada com base nas perdas líquidas (vómito e diarreia), peso vivo do animal e monitorização cuidada da frequência respiratória, ruídos pulmonares e pressão arterial. A monitorização do estado electrolítico e de ácido-base pode revelar a necessidade de reposição de electrólitos (Sykes, 2014).

Enquanto nos animais poliúricos é necessária a administração de grande quantidade de fluídos (superior a 200 mL/Kg/dia), nos animais em oligúria (produção urinária inferior a 2 mL/Kg/h) ou anúria, taxas de reposição muito elevadas podem conduzir a sobrehidratação e insuficiência respiratória. É, portanto, importante a monitorização cuidada do débito urinário nos animais oligúricos ou anúricos, através de um sistema fechado de colheita de urina (Sykes, 2014; Sykes et al., 2011). A oligúria e a anúria devem ser abordadas, inicialmente, com reidratação (Greene, 2012). Caso estas se mantenham pode ser administrado manitol em bolus IV lento na dose de 0,25 a 1 mg/kg. Se a produção de urina aumentar, a manutenção de manitol em infusão contínua 1 a 2 mg/kg/min IV ou 0,25 a 0,5 mg/kg a cada 4 a 6 horas pode ser adequada. A furosemida deve ser preferida em situações de sobrehidratação ou hipercalémia. Um aumento da produção urinária deve ser observado 20 a 60 minutos após a administração IV de furosemida na dose 2 a 6 mg/kg e esta deve ser repetida a cada 6 a 8 horas, no caso de haver resposta. Pode ser instituída, em alternativa, a administração de furosemida em infusão contínua na taxa de 0,25 a 1 mg/kg/h, acompanhada de frequente monitorização (Ettinger & Feldman, 2010).

Mais de 80% dos animais que morreriam das consequências da urémia grave sobrevivem se tiverem acesso a terapia de substituição renal. Hemodiálise intermitente ou terapia de substituição renal contínua estão indicadas nos animais com débito urinário inadequado que estão a desenvolver sobrecarga de volume, com ureia superior a 80 mg/dL ou com sinais de urémia não responsivos à abordagem médica. Espera-se a recuperação da função renal ao final de 2 a 4 semanas de diálise, sendo, algumas vezes, apenas necessários 1 a 3 tratamentos até instituição da poliúria e início da recuperação (Sykes et al., 2011).

A alimentação oral deve ser descontinuada nos animais que apresentem vómito e pode ser necessária a administração de antieméticos de acção central e antiácidos de administração parenteral (bloqueadores dos receptores de histamina H2 e inibidores da bomba de protões) (Greene, 2012).

A presença de petéquias e equimoses pode indicar trombocitopénia por vasculite ou CID nos animais gravemente afectados, devendo ser considerado o tratamento anticoagulante com ou sem reposição de factores de coagulação. Deve-se proceder a transfusão de plasma ou de sangue fresco inteiro na presença de grave hipoalbuminémia ou na suspeita de pancreatite, concomitantes (Greene, 2012).

Actualmente é desconhecido o tratamento ideal para cães com LPHS (Sykes, 2014). Alguns cães podem necessitar de oxigenoterapia e ventilação mecânica, se gravemente afectados. Em humanos com grave leptospirose pulmonar, o tratamento precoce com doses de choque de bolus intravenosos de metilprednisolona foi associado a uma diminuição drástica da mortalidade (Greene, 2012). Estudos em Medicina Humana revelaram melhorias após tratamento com ciclofosfamida (Trivedi, Vasava, Patel, & Bhatia, 2009) e transfusão de plasma, o que sugere o papel chave de mecanismos imunológicos na patogénese deste síndrome (Trivedi et al., 2010). Tanto em humanos como em cães com LPHS, o tratamento com dexametasona e desmopressina não revelou resultados (Ni wattayakul et al., 2010; Sykes et al., 2011). A terapia imunossupressora deve ser alvo de estudo futuro no tratamento da manifestação pulmonar da leptospirose em cães (Greene, 2012).

9.3 Monitorização hospitalar

É recomendada a referenciação dos casos para uma unidade clínica de cuidados permanentes (24 horas), devido à necessidade de monitorização intensiva (Sykes, 2014; Sykes et al., 2011). Durante a hospitalização deve ser realizado um painel bioquímico a cada 24 horas para monitorização da função renal, enzimas hepáticas, concentração de proteínas e estado electrolítico e ácido-base. O hematócrito deve ser avaliado a cada 24 horas e o hemograma realizado a cada 48h de hospitalização. O débito urinário deve ser registado todas as horas, inicialmente, através do sistema fechado de colheita de urina. Exames físicos seriados, com a frequente monitorização do peso corporal, frequência respiratória, ruídos pulmonares e pressão arterial são indicados para a detecção precoce de sinais de sobreidratação (Sykes et al., 2011).

9.4 Seguimento clínico

Como mínimo, os cães infectados por leptospirose devem ser reavaliados após uma semana da alta hospitalar. Um painel bioquímico e urianálise, com especial interesse na densidade específica, devem ser realizados. Os cães que sofreram trombocitopénia ou anemia durante o período de hospitalização devem realizar um hemograma. Este momento também representa uma oportunidade para obter uma titulação de anticorpos de fase de convalescença (Sykes et al., 2011).

10. Prognóstico

10.1 Mortalidade (taxa de sobrevivência)

Têm sido descritas várias taxas de sobrevivência que variam consoante a localização geográfica e os serovares suspeitos na infecção. Um estudo alemão referiu a alta de 52% dos animais infectados e na Suíça foi descrita a sobrevivência de 56,7% dos animais que tiveram alta (Geisen et al., 2007; Major et al., 2014), taxas reduzidas relativamente a estudos americanos que relatam taxas de sobrevivência de 78% (Birnbaum et al., 1998; Goldstein et al., 2006). Centros com acesso a hemodiálise chegam a exibir taxas de sobrevivência superiores a 80% (Adin & Cowgill, 2000; Sykes et al., 2011). A taxa de sobrevivência para cães com sinais de LPHS é desconhecida, mas é, provavelmente, mais baixa (Sykes, 2014). Um estudo onde 70% dos animais apresentaram quadro pulmonar demonstrou uma taxa de sobrevivência de 64% (Kohn et al., 2010).

10.2 Indicadores de prognóstico

Em Medicina Humana, o juízo dos achados laboratoriais tem permitido a predição da gravidade e mortalidade da doença nos pacientes afectados. Dispneia, infiltrado alveolar grave visível na radiografia torácica, elevada contagem leucocitária no sangue, trombocitopénia, oligúria e anomalias na repolarização no electrocardiograma são todos indicadores de mau prognóstico na leptospirose humana (Greene, 2012; Rajapakse, Rodrigo, & Haniffa, 2010). O grau de infecção também é considerado um indicador de prognóstico estando a presença de mais de 10^4 leptospiras/ml associada à morte do paciente (Rajapakse et al., 2010).

Um estudo em leptospirose canina sobre infecção pelo serogrupo Australis demonstrou que o tempo entre o aparecimento da sintomatologia e a admissão na unidade de atendimento veterinário não apresentou uma diferença estatisticamente significativa entre os animais sobreviventes e os não sobreviventes (Mastrorilli et al., 2007). Dos 16 animais infectados por leptospiras desse serogrupo, 9 apresentaram SRIS, facto este que não teve impacto significativo no desfecho da doença. Houve envolvimento multiorgânico com um consistente envolvimento renal e 5 em 16 animais apresentaram CID subclínica, ou, mais propriamente, um estado de hipercoagulabilidade, não servindo no entanto como indicador de prognóstico (Mastrorilli et al., 2007).

Sabe-se que o grau de trombocitopénia se correlaciona com a gravidade do quadro respiratório e conseqüente mortalidade dos cães que sofrem de leptospirose, sendo, por isso, um marcador de mau prognóstico da doença (Greene, 2012; Kohn et al., 2010).

A troponina sérica cTnI (troponina cardíaca) foi sugerida como potencial marcador de prognóstico, em animais infectados pelo serogrupo Australis. Esta apresentou-se significativamente mais elevada nos animais que não sobreviveram à infecção. Albumina sérica, proteínas totais, Rácio proteína C reactiva/haptoglobina (rácio CRP/Hpt), rácio UPC e rácio albumina-creatinina urinárias (rácio UAC) foram outros indicadores associadas com o desfecho da doença no mesmo estudo (Mastrorilli et al., 2007).

10.3 Resposta à terapêutica

O sucesso do tratamento está associado ao retorno dos parâmetros renais para intervalos de referência num prazo de 10 a 14 dias. A contagem de plaquetas deverá melhorar dentro de uma semana após início da antibioterapia e a bilirrubina sérica diminui mais lentamente que as enzimas hepáticas (Sykes et al., 2011).

A regeneração do tecido renal pode perdurar por mais quatro semanas após o tratamento da infecção e nalguns animais, principalmente quando tratado num curso mais tardio da doença, pode ocorrer dano renal permanente (Sykes et al., 2011).

A fluidoterapia não deve ser descontinuada repentinamente e alguns animais podem necessitar suporte nutricional enteral ou parenteral enquanto a inapetência persistir (Sykes et al., 2011).

11. Prevenção

11.1 Vacinação

Apesar da existência de imunidade celular, a resposta imunitária face às leptospiras é predominantemente humoral. Os anticorpos são sobretudo dirigidos para o LPS e outras proteínas da membrana externa, que variam antigenicamente entre serovares (Greene, 2012).

O grau de protecção correlaciona-se melhor com a presença dos anticorpos opsonicos (fagocíticos) em vez dos aglutinantes, medidos no MAT. Uma vez que os anticorpos aglutinantes não são eficazes na neutralização ou destruição do organismo, as titulações obtidas no MAT não podem ser utilizadas para prever o grau de protecção oferecido pelo sistema imunitário. De facto, podem identificar-se animais que estão protegidos contra uma infecção experimental, com poucos ou nenhuns anticorpos medidos pelo MAT (Greene, 2012).

A imunização através da vacinação tem sido eficaz na redução da prevalência e gravidade da leptospirose em cães (Greene, 2012). As vacinas são constituídas, actualmente, por bacterinas inactivadas e produzem imunidade serogrupo específica (Greene, 2012; Sykes, 2014). Foi, no entanto, demonstrada a presença de imunidade cruzada parcial nalguns estudos experimentais (Sonrier et al., 2000). Um estudo demonstrou alguma imunização cruzada entre serogrupos diferentes estimulada por uma vacina viva atenuada (Srikram et al., 2011), no entanto este tipo de vacinas não é, hoje em dia, utilizada devido à sua instabilidade e possível conversão para virulência (Greene, 2012).

A vacina bivalente, contendo os serogrupos Canicola e Icterohaemorrhagiae, foi a primeira a ser introduzida no mercado (Sykes, 2014) e a utilizada em Portugal até à data. Segundo um estudo que analisou 42 cães diagnosticados com leptospirose na Universidade de Munique, as vacinas utilizadas até à data, compostas por bacterinas dos serogrupos Canicola e Icterohaemorrhagiae, não induzem imunidade cruzada contra outros serogrupos e, apesar da vacinação, estes dois serogrupos ainda se responsabilizam por infecções em cães não vacinados (Geisen et al., 2007). Apesar da diminuição da seroprevalência do serogrupo Canicola na Europa, o risco de suprimir a vacinação contra esta leptospira tão adaptada a um único hospedeiro é o da sua prevalência aumentar rapidamente com a diminuição da imunidade da população alvo. Como tal, dado o cão ser o seu único hospedeiro reservatório, a vacinação contra Canicola deve ser mantida (Ellis, 2010).

Actualmente, foram introduzidas vacinas na Europa contendo bacterinas dos serovares Portland-vere (serogrupo Canicola), Copenhageni (serogrupo Icterohaemorrhagiae),

Bratislava (serogrupo Australis) e Dadas (serogrupo Grippotyphosa) (Sykes, 2014). A duração da imunidade pós vacinal é de pelo menos 12 meses, período durante o qual protege o animal da doença clínica e do estado de portador renal (Klaasen, Molkenboer, Vrijenhoek, & Kaashoek, 2003; Minke et al., 2009). Esta vacina já se encontra disponível em Portugal com a AIM 857/01-05/12CIVPT (Direcção Geral da Alimentação e Veterinária, 2015). Para além das vacinas bivalentes anteriormente mencionadas, existe também uma vacina trivalente, composta dos serogrupos Canicola, Icterohaemorrhagiae e Grippotyphosa, colocada recentemente no mercado com a AIM 858/01/12RIVPT e 859/01/12RIVPT (Direcção Geral da Alimentação e Veterinária, 2015)

A recomendação do *Vaccination Guidelines Group* (VGG) da *World Small Animal Veterinary Association* (WSAVA) para a vacinação contra a leptospirose em cachorros consiste em administrar a primeira dose entre as 12 e as 16 semanas de vida após completar o protocolo da vacina polivalente (parvovirose, esgana, hepatite viral, traqueíte infecciosa...), com uma segunda dose 3 a 4 semanas depois. Nos adultos a primovacinação consiste de duas doses espaçadas de 3 a 4 semanas e a revacinação deve ser realizada anualmente, ou mais frequentemente, de acordo com a vacina utilizada e risco epidemiológico (Day, Horzinek, & Schultz, 2010).

Foram descritas no passado reacções adversas à vacinação contra leptospirose, associadas a reacções de hipersensibilidade tipo I como anafilaxia, especialmente em cães de raça pequena. No entanto, este tipo de reacções pode ocorrer em cães de qualquer raça e são cada vez menos reportadas (prevalência <1%) pelos Médicos Veterinários e pela indústria (Sykes, 2014; Sykes et al., 2011).

A vacinação deve ser aconselhada a todos os cães com risco de exposição. Este risco varia geograficamente. Cães com contacto com animais selvagens, que nadem ou que bebam de fontes de água ambiental, como os cães de quinta por exemplo, devem ser vacinados. Nas áreas urbanas onde a leptospirose ocorre nos cães de quintal, todos os cães estão em risco, devendo a vacinação contra a leptospirose inserir-se nos protocolos de rotina (Sykes, 2014; Sykes et al., 2011).

De momento, desconhece-se a prevalência de recorrência de leptospirose em cães após um tratamento adequado. Um estudo de Medicina Humana realizado na Região Autónoma dos Açores sugere a existência de algum grau de protecção a longo termo contra a doença, com atenuação dos sinais clínicos em caso de reinfeccção (Esteves et al., 2014). A vacinação anual de cães que recuperaram de leptospirose é recomendada, uma vez que estes animais continuarão em risco de exposição. No entanto mais estudos são necessários para o

conhecimento da duração da imunidade e protecção cruzada produzidas por uma infecção natural (Sykes, 2014; Sykes et al., 2011).

11.2 Outros métodos de prevenção

A prevenção da leptospirose envolve a eliminação do estatuto de portador da doença. Infelizmente, os hospedeiros reservatório selvagens e os animais domésticos subclínicamente infectados, preservam e eliminam o organismo intermitentemente pela urina (Greene, 2012). Diminuir o acesso dos cães a potenciais fontes de infecção como zonas pantanosas e com água estagnada, e minimizar o contacto com animais selvagens, através de vedações e controlo de roedores, pode ajudar na prevenção da infecção (Sykes, 2014; Sykes et al., 2011), assim como a manutenção das condições de higiene nos cães e o isolamento dos animais infectados (Greene, 2012).

12. Saúde Pública

12.1 Leptospirose humana

A leptospirose é a zoonose bacteriana com maior distribuição mundial (Lau, Smythe, & Weinstein, 2010)

A leptospirose em humanos é sempre contraída a partir de uma fonte animal. A transmissão de humano para humano é, em termos práticos, inexistente e a doença classifica-se globalmente como uma zoonose. As leptospiras persistem, principalmente, nos túbulos renais proximais dos portadores e são eliminadas pela urina. Quase todos os mamíferos, incluindo os mamíferos aquáticos, e marsupiais podem ser portadores crónicos da doença. Os humanos, como hospedeiros acidentais, raramente se tornam portadores crónicos, sofrendo, em alternativa, infecções de carácter agudo acompanhadas, por vezes, de sequelas a longo prazo (Adler & Peña Moctezuma, 2010). A doença aparece frequentemente associada a práticas de lazer em ambiente aquático ou a algumas profissões, como o trabalho em minas, esgotos, agricultura e Medicina Veterinária (Speidel et al., 2008).

A leptospirose humana é geralmente uma doença benigna e auto-limitante (Speidel et al., 2008) e é, provavelmente, subdiagnosticada, pois apresenta-se através de sinais típicos de uma gripe. No entanto é possível dar-se a progressão para insuficiência hepática e renal fulminante e envolvimento pulmonar (doença de Weil), culminando na morte do indivíduo, nos casos graves, deixados por tratar (Adler & Peña Moctezuma, 2010; Binder & Mermel, 1998; Sessions & Greene, 2004b). Sinais clínicos como febre, calafrios, cefaleia, mialgia, náusea, vômito, icterícia e anemia são característicos da leptospirose humana e surgem após um tempo de incubação médio de 10 dias (2 a 30 dias), no entanto sinais como derrame conjuntival, petéquias, hemoptise, erupções cutâneas, sinais de miocardite, meningite e comprometimento renal e sinais respiratórios também podem surgir (Declaração de rectificação nº 609-A/2014 de 16 de Junho; Lau et al., 2010; Sessions & Greene, 2004b; Speidel et al., 2008; Sykes, 2014; Vieira, Gama-Simões, & Collares-Pereira, 2006).

Num estudo retrospectivo de 18 anos foram confirmados 1024 casos de leptospirose humana em Portugal, sendo a causa de morte em 183 pacientes. Entre os anos 1986 e 2003 foi observada uma média de 53 casos por ano, sendo a taxa de incidência média muito superior nos Açores (Ilha de São Miguel e Terceira) em comparação com a Madeira e Portugal Continental. Da totalidade dos casos, 67% corresponderam a pessoas do sexo masculino e observou-se distribuição sazonal da doença, sendo superior nos meses de Inverno (Vieira et al., 2006). Tratando-se de uma doença de declaração obrigatória em Medicina Humana a

Direcção Geral da Saúde (DGS) publica periodicamente o número de casos notificados em Portugal (quadros 3 e 4). De 2002 a 2006 foram notificados 239 casos de leptospirose humana (Direcção-Geral da Saúde, 2007). De 2009 a 2012 foram notificados 115 casos confirmados num total de 120 suspeitos, em pessoas maioritariamente do sexo masculino (Direcção-Geral da Saúde, 2014).

Quadro 3 – Número de Leptospirose humana notificados em Portugal entre 2002 e 2006 (Fonte: Direcção-Geral da Saúde, 2007).

Ano	Número de casos notificados
2002	37
2003	72
2004	57
2005	32
2006	41
Total	239

Quadro 4 – Número de casos de Leptospirose Humana notificados, por classificação de caso e por ano, em Portugal entre 2009 e 2012 (Fonte: Direcção-Geral da Saúde, 2014).

Ano	Classificação de caso			
	Confirmado	Provável	Possível	Total
2009	32	1	0	33
2010	29	0	0	29
2011	33	1	0	34
2012	21	0	3	24
Total	115	2	3	120

12.2 O Homem e o risco de exposição

A leptospirose é encontrada por todo o mundo, particularmente nas regiões tropicais e subtropicais onde as condições ambientais favorecem a sobrevivência e transmissão das leptospiras. Apesar da carência de dados epidemiológicos fidedignos, são conhecidas áreas de elevado risco da doença em humanos incluindo Índia, Sri Lanka, Tailândia, Vietname, Malásia, China, Seychelles, Caraíbas, Brasil e ilhas do Pacífico (Lau et al., 2010).

Com a crescente popularidade do ecoturismo e das actividades de aventura no exterior, os viajantes estão, provavelmente, cada vez mais expostos a leptospirose (Lau et al., 2010). Nos países desenvolvidos a leptospirose humana está associada a actividades recreativas na água. Foram reportados vários surtos após participação em actividades desportivas como rafting,

triatlos e exploração de grutas (Greene, 2012; Monahan, Miller, & Nally, 2009; Stern et al., 2010). Também o contacto com roedores selvagens foi descrito como fonte de leptospirose em humanos, quando estes são adoptados como animais domésticos, e também através da contaminação de comida com urina infectada (Greene, 2012; Strugnell et al., 2009). Pessoas com contacto frequente com espécies pecuárias também apresentam um certo risco de exposição (Sykes, 2014).

As épocas de cheias representam um grande factor de risco para o aparecimento de leptospirose em humanos, sobretudo nos países em desenvolvimento. A exposição das membranas mucosas ou de pele lesionada a ambientes pouco higiénicos e contaminados com urina de roedores também representa uma possível forma de transmissão da doença (Greene, 2012).

Apesar de se encontrar por confirmar, com base em métodos de tipificação molecular (Sykes, 2014; Sykes et al., 2011), a hipótese de que os cães estejam envolvidos na transmissão de leptospirose a humanos não foi excluída (Greene, 2012).

12.3 Risco zoonótico no hospital veterinário

A fim de diminuir o risco de zoonose em ambiente hospitalar, todos os cães com sinais de insuficiência renal aguda devem ser considerados suspeitos de leptospirose e manipulados de acordo com essa suspeita, até à obtenção de outro diagnóstico. O movimento destes animais pelo hospital deve ser minimizado e, uma vez que as leptospiras não se transmitem por contacto directo entre cães na fase aguda, os pacientes criticamente afectados e que requerem monitorização frequente e vigilância cuidada não precisam de ser hospitalizados em unidades de isolamento. Devem, no entanto, ser alojados ao nível do solo, em jaulas identificadas da suspeita de leptospirose (Sykes et al., 2011).

Mulheres grávidas e pessoas imunodeprimidas não devem contactar com estes animais. Deve ser utilizado equipamento de protecção individual por qualquer pessoa que manipule estes animais, como luvas de látex, batas descartáveis, máscara e óculos protectores ou, em alternativa, uma máscara completa, especialmente nos momentos em que aerossolização da urina é possível, como na manipulação de algalias ou limpeza de urina. Especial cuidado deve ser adoptado, para evitar picadas de agulha ou outro contacto com o sangue (Sykes et al., 2011).

Os pacientes suspeitos que não se encontram algaliados devem ser passeados frequentemente, para que não urinem no hospital. Para o efeito, devem-se evitar os corredores principais ou utilizar macas como alternativa. Os pacientes devem urinar numa área restrita, preferencialmente de fácil descontaminação (Sykes et al., 2011).

As jaulas devem ser limpas e desinfectadas diariamente com soluções à base de lixívia. Equipamento de protecção individual deve ser utilizado durante a limpeza das jaulas. A lavagem à máquina normal das mantas e tapetes utilizados nas jaulas inactiva eficazmente as leptospiras. As zonas de exterior onde os cães infectados urinaram devem ser lavadas com soluções de 10% de lixívia. O sangue, urina e tecidos dos animais suspeitos deve ser manipulado como resíduo hospitalar e no caso de morte ou eutanásia de um animal infectado, os indivíduos que manipularão a carcaça devem ser notificados do risco zoonótico (Sykes, 2014; Sykes et al., 2011).

12.4 Risco zoonótico em casa

Os donos de cães afectados pela leptospirose devem ser educados para a natureza zoonótica da doença. Cães em tratamento representam um risco de transmissão da doença provavelmente baixo, uma vez que a doxiciclina elimina as leptospiras do rim no espaço de três dias e a eliminação das bactérias pela urina só começa ao fim de sete a dez dias de infecção. No entanto, os donos não devem descurar de cuidados até ao final do tratamento antibacteriano, devendo evitar o contacto com a urina do seu cão. Os cães devem ser encorajados a urinar longe dos cursos de água e do acesso a outros animais e pessoas e devem ser utilizados os desinfectantes domésticos e luvas durante a lavagem da urina, caso esta ocorra dentro de casa (Sykes, 2014; Sykes et al., 2011).

Dado o potencial risco zoonótico da doença, o tratamento de cães que coabitem com um cão infectado é recomendado, pois estes podem ter sido, também, expostos à fonte ambiental de leptospiras responsáveis pela infecção. O tratamento profilático recomendado consiste em doxiciclina, 5mg/Kg PO, cada 12 horas, durante 14 dias e, idealmente, acompanhado de monitorização de titulação de anticorpos de fase aguda e de convalescença (Sykes, 2014; Sykes et al., 2011). Nas situações em que se prevê a inevitabilidade da exposição de uma pessoa a um ambiente endémico, por curto período de tempo, o indivíduo pode optar por quimioprofilaxia com doxiciclina, 200mg/kg PO, semanal (Speidel et al., 2008).

Os donos devem ser aconselhados a procurar assistência médica caso surja doença na mesma altura do diagnóstico do seu animal, ou caso procurem maior esclarecimento acerca da doença em humanos (Sykes, 2014; Sykes et al., 2011).

III - Estudo Clínico

1. Objectivos

Com este estudo pretendeu-se contribuir para a caracterização da leptospirose canina na Grande Área Metropolitana de Lisboa no período de um ano e três meses. Teve-se como objectivo definir o quadro clínico e alguns aspectos epidemiológicos da doença associados ao período temporal do estudo, comparando-os com a bibliografia mais recente. Com a análise dos resultados obtidos pretendeu-se também, contribuir para o estabelecimento de índices de prognóstico.

2. Material e Métodos

2.1 População em estudo

Para o presente estudo foram reunidos os historiais médicos de 28 cães que se apresentaram em 3 Hospitais de Animais de Companhia abrangidos pela Grande Área Metropolitana de Lisboa no período de Janeiro de 2014 até Março de 2015. As unidades hospitalares colaboradoras deste estudo foram o Hospital Veterinário do Atlântico (HVA), pertencente ao concelho de Mafra, o Hospital Veterinário do Restelo (HVR) e o Hospital Escolar Veterinário (HEV) da Faculdade de Medicina Veterinária (FMV) da Universidade de Lisboa (ULisboa), ambos pertencentes ao concelho de Lisboa.

Todos os animais suspeitos de leptospirose canina foram avaliados, sendo incluídos no estudo os casos cuja suspeita da doença se baseou em critérios epidemiológicos e clínicos compatíveis e preenchimento de pelo menos um dos seguintes critérios laboratoriais:

1. Reacção positiva ($\geq 1:100$) no MAT para outros serogrupos que não Canicola ou Icterohaemorrhagiae.
2. Titulação elevada ($\geq 1:800$) no MAT para os serogrupos Canicola ou Icterohaemorrhagiae.
3. Titulação positiva ($\geq 1:200$) de IgG ou IgM no ELISA.
4. Resultado positivo no PCR sanguíneo ou urinário.
5. Observação de leptospiros por histopatologia renal.

2.2 Distribuição sazonal

Foi considerada a data de apresentação de cada animal na unidade de hospitalização, para a descrição da distribuição sazonal da doença, no período de tempo considerado no estudo.

2.3 Diagnóstico

No MAT foram incluídos microrganismos representantes dos serogrupos Australis (Bratislava e Australis), Autumnalis, Canicola, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae (Copenhageni) e Pomona. Foram aceites como positivas as titulações iguais ou superiores a 1:100 e considerou-se o serogrupo com maior titulação como o suspeito infectante. Nos casos em que se observou elevada titulação, de igual valor, para mais do que um serogrupo, a infecção foi considerada mista.

No ELISA foi medida a titulação sanguínea de anticorpos IgG isoladamente ou de IgG e IgM em paralelo, considerando-se positiva qualquer reacção de titulação igual ou superior a 1:200. Para a detecção de ADN de leptospira patogénica recorreu-se à técnica de Real Time-PCR com a utilização de um kit comercial da Genekam Biotechnology com a referência MKFR001. A demonstração da presença de ADN leptospiral no sangue ou urina de animais suspeitos por PCR foi considerada positiva, assim como a evidência de leptospiros no tecido renal, em amostras recolhidas em exame de necrópsia e processadas por impregnação com nitrato de prata (método de Levaditti), em histopatologia.

2.4 Situação

Para cada caso clínico foi categorizado o grau de suspeita de leptospirose (denominado no formulário por situação). Consideraram-se confirmados os casos diagnosticados por PCR e por identificação de leptospiros por histopatologia, suspeita forte os casos com titulação elevada ($\geq 1:800$) no MAT; suspeita moderada os casos com titulação positiva ($\geq 1:200$) de IgM ou titulação elevada ($\geq 1:800$) de IgG no ELISA; suspeita leve casos com titulação média/baixa ($< 1:800$) para outros serogrupos que não o Canicola e o Icterohaemorrhagiae no MAT e titulação média/baixa ($< 1:800$) de IgG no ELISA.

2.5 Anamnese e Exame Clínico

Para cada animal foi recolhida a informação referente à apresentação clínica obtida na anamnese e no exame clínico realizado no dia de apresentação do animal na unidade hospitalar. Foram tidos em conta os casos de referência e de segunda opinião, tendo sido recolhida, nestes casos, a informação respectiva ao exame clínico realizado na unidade de referência. A informação proveniente das unidades referentes foi incluída na anamnese.

2.6 Hemograma, Bioquímicas e Ionograma

Apenas os dados de hemograma, bioquímica e ionograma referentes ao dia de apresentação foram recolhidos. Nos casos em que alguma dessas análises sanguíneas não tenha sido realizada no dia de apresentação, foi registado o primeiro exame realizado após essa data. Nos casos de referência que vieram acompanhados de análises sanguíneas, foram registadas essas análises, caso não tenham sido repetidas na unidade de referência no dia de apresentação em consulta.

2.7 Urianálise

Foram recolhidos os achados de urianálise realizados no período de hospitalização, assim como o resultado do rácio UPC (rácio proteína/creatinina urinárias) e da urocultura nos casos em que foram realizados.

2.8 Imagiologia

Nos casos em que tenha sido realizada ecografia foram registadas as alterações apresentadas no relatório imagiológico. Nos casos acompanhados de radiografia torácica foi registada a evidência de sinais compatíveis com hemorragia pulmonar, demonstrada por aumento da radiopacidade através de padrão alveolar difuso, padrão intersticial difuso ou padrão alveolar/intersticial difuso.

2.9 Tratamento e Hospitalização

Foi registado o tratamento realizado em cada caso em termos de antibioterapia e foi assinalado se o animal fez corticoterapia e se foi sujeito a terapia de substituição renal, como hemodiálise, em qualquer fase do curso clínico da doença.

Foi registada a duração da hospitalização em dias, sendo identificados os casos que apresentaram quadro pulmonar durante a hospitalização, quer pela presença de sinais clínicos, quer pela presença de sinais radiográficos compatíveis com hemorragia pulmonar. Para cada baixa foi indicado se se recorreu ou não à eutanásia e foi identificada a causa de morte.

2.10 Estatística

Os dados foram recolhidos em associação com o preenchimento do formulário produzido para a descrição de cada caso (anexo 1). Os formulários foram analisados através do programa Epi Info 7 onde se utilizaram as ferramentas de cálculo de frequências e médias. Para a testagem de associação entre variáveis independentes recorreu-se ao teste exacto de Fischer e o risco relativo (relative risk) e para a comparação entre médias utilizou-se o teste kruskal-wallis, onde um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3. Resultados

3.1 População em estudo

A listagem dos dados obtidos pelo preenchimento dos formulários, pode ser consultada no anexo 2.

A população em estudo compreendeu de 28 animais diagnosticados com leptospirose, cumprindo os critérios de inclusão neste estudo. Quanto à origem de proveniência, 14 casos (50%) provieram do HVA, 8 (29%) do HVR e 6 (21%) da FMV, tendo sido 14 (50%) dos casos referenciados por outros centros de atendimento médico veterinário (CAMV) e apenas 1 caso (4%) atendido como segunda opinião.

Foram distinguidos 16 machos (57%) e 12 fêmeas (43%). Do total 13 (46%) eram animais férteis, 5 das fêmeas (18%) eram esterilizadas e dos restantes 10 (36%) não se obteve informação em relação ao estado. Não foi observada predominância de raça, sendo que 10 cães (36%) eram de raça indeterminada (quadro 5).

Quadro 5 – Lista das raças apresentadas no estudo e sua frequência.

Raça	Frequência	Percentagem
American Staffordshire Terrier	1	3,57%
Basset Hound	1	3,57%
Border Collie	2	7,14%
Braco Alemão	1	3,57%
Bulldog Americano	1	3,57%
Dálmata	1	3,57%
Golden Retriever	1	3,57%
Indeterminada	10	35,71%
Labrador	3	10,71%
Pastor Alemão	2	7,14%
Pointer Inglês	1	3,57%
Rottweiler	1	3,57%
Serra d'Aires	1	3,57%
Teckel	1	3,57%
Weimaraner	1	3,57%
TOTAL	28	100,00%

A idade média observada foi de 5,85 anos ($\pm 3,12$), variando dos 0 aos 11 anos. Agrupando os animais por grupos etários, foi observada uma predominância de casos em animais adultos (entre os 2 e os 7 anos de idade), sendo que de um dos cães não se obteve informação acerca da idade (quadro 6).

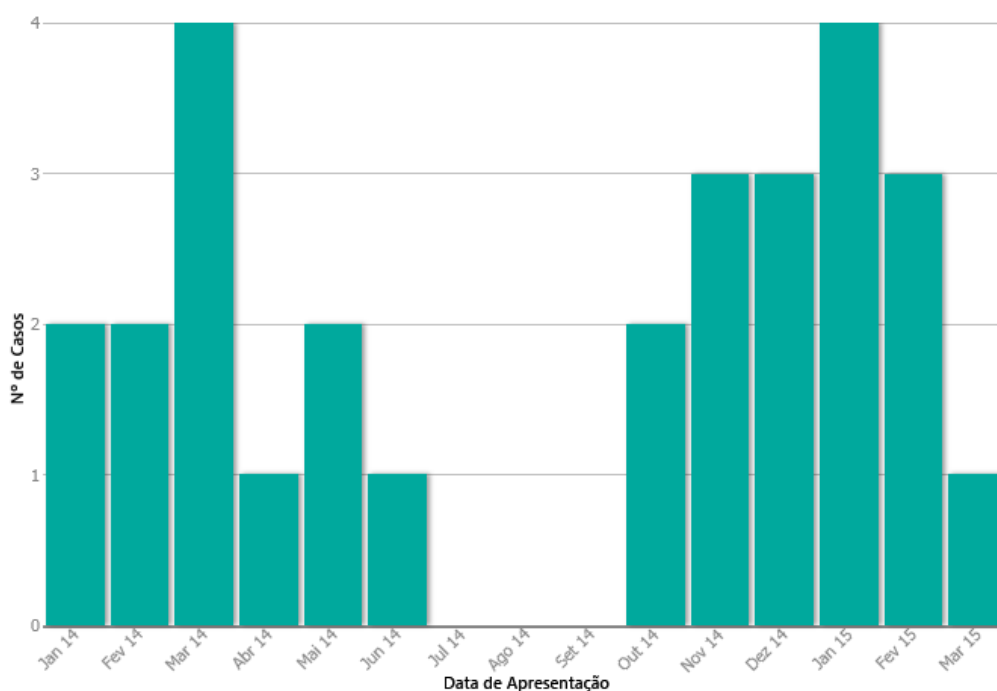
Quadro 6 - Frequência das idades observadas no estudo, agrupadas em grupos etários.

Grupos Etários	Frequência	Porcentagem
Junior (0 a 1 anos)	2	7,41%
Adulto (2 a 7 anos)	16	59,26%
Sénior (8 a 11 anos)	9	33,33%
TOTAL	27	100,00%

3.2 Distribuição sazonal

Foi observado maior número de casos no mês de Março de 2014 e no mês de Janeiro de 2015, parecendo haver uma maior distribuição dos casos pelos meses de Outono e Inverno, não ocorrendo nenhum caso nos meses de Verão (Julho, Agosto e Setembro). A distribuição sazonal encontra-se representada no gráfico 1.

Figura 11 - Distribuição do número de casos, incluídos no estudo clínico, em função do mês de apresentação em consulta.



3.3 Diagnóstico

De acordo com o critério para a classificação do diagnóstico da doença foram considerados confirmados 7 casos (25%), 3 suspeitas fortes (11%), 13 suspeitas moderadas (46%) e 5 suspeitas leves (18%). Em relação à eficácia de diagnóstico nas diferentes unidades hospitalares identificou-se maior número de casos confirmados no HVA. A frequência para cada classificação do diagnóstico da doença por cada unidade hospitalar pode ser consultada no quadro 7. O ELISA foi o método de diagnóstico laboratorial mais utilizado (17 casos, 61%), seguido do MAT (8, 29%) e do PCR (5, 18%) tendo-se recorrido a histopatologia renal em apenas 2 casos (7%).

Quadro 7 – Frequência de casos confirmados, suspeita forte, suspeita moderada e suspeita leve por cada unidade hospitalar incluída no estudo clínico.

Confirmado			Suspeita Forte		
Hospital	Frequência	Percentagem	Hospital	Frequência	Percentagem
FMV	0	0,00%	FMV	0	0,00%
HVA	6	85,71%	HVA	0	0,00%
HVR	1	14,29%	HVR	3	100,00%
TOTAL	7	100,00%	TOTAL	3	100,00%
Suspeita Moderada			Suspeita Leve		
Hospital	Frequência	Percentagem	Hospital	Frequência	Percentagem
FMV	6	46,15%	FMV	0	0,00%
HVA	7	53,85%	HVA	1	20,00%
HVR	0	0,00%	HVR	4	80,00%
TOTAL	13	100,00%	TOTAL	5	100,00%

Dos 17 casos que recorreram ao teste ELISA para o diagnóstico, em 5 (29%) apenas se mediou a titulação de IgG, obtendo-se 4 titulações elevadas ($\geq 1:800$) e 1 baixa (1:400). Nos restantes 12 casos (71%) foram medidas as titulações de IgG e IgM em paralelo obtendo-se 10 casos (59%) com titulação positiva para IgG e IgM, 1 caso (6%) com titulação negativa para IgG e positiva para IgM e 1 caso (6%) sem seroconversão de IgG nem de IgM mas confirmado posteriormente por PCR.

O diagnóstico com recurso ao MAT foi realizado apenas no HVR onde foi identificado o serogrupo Australis com maior predominância (3 serovar Australis, 37,5% e 1 serovar Bratislava, 12,5%), seguido de 2 casos de infecção mista, 1 caso de Grippotyphosa e 1 Pomona. As titulações para cada caso encontram-se no quadro 8.

Quadro 8 – Serogrupos suspeitos e respectivas titulações, nos 8 casos em que foi realizado MAT.

Serogrupo (serovar)	Titulação
Australis (Australis)	1:100
Australis (Australis)	1:400
Australis (Australis)	1:400
Australis (Bratislava)	1:800
Grippotyphosa	1:200
Pomona	1:400
Misto: Autumnalis e Icterohaemorrhagiae (Copenhageni)	1:1600
Misto: Australis, Autumnalis e Pomona	1:1600

3.4 Sinais Clínicos

Os sinais clínicos mais frequentes nos dados de anamnese foram o vômito, presente em 20 casos (71%), letargia, presente em 19 (68%), anorexia, presente em 16 (57%) e inapetência, presente em 10 (36%).

Ao exame clínico foi observado com maior frequência desidratação, em 10 casos (36%), mucosas ictéricas, em 9 (32%), palpação abdominal dolorosa, em 9 (32%) e auscultação pulmonar alterada, em 4 (14%). A lista completa de achados de anamnese e de achados no exame clínico pode ser consultada nos quadros 9, 10 e 11.

Quadro 9 – Lista de sinais clínicos obtidos pela anamnese recolhida no dia de apresentação e suas frequências.

Achados de Anamnese	Frequência	Porcentagem
Vômito	20	71,43%
Letargia	19	67,86%
Anorexia	16	57,14%
Inapetência	10	35,71%
Diarreia	5	17,86%
Perda de Peso	3	10,71%
Poliúria	2	7,14%
Polidipsia	2	7,14%
Fraqueza muscular	2	7,14%
Taquipneia	1	3,57%

Quadro 10 - Lista das combinações mais frequentes de sinais clínicos obtidos pela anamnese recolhida no dia de apresentação e suas frequências.

Achados de Anamnese	Frequência	Porcentagem
Vômito + Letargia	11	39,29%
Vômito + Anorexia	11	39,29%
Letargia + Anorexia	9	32,14%
Letargia + Inapetência	8	28,57%
Vômito + Inapetência	6	21,43%
Anorexia + Inapetência	5	17,86%

Quadro 11 - Lista de sinais clínicos obtidos no exame clínico realizado no dia de apresentação e suas frequências.

Achados de Exame Clínico	Frequência	Porcentagem
Desidratação	10	35,71%
Mucosas ictéricas	9	32,14%
Palpação abdominal dolorosa	9	32,14%
Auscultação pulmonar alterada	4	14,29%
Taquicárdia	3	10,71%
Hipotermia	3	10,71%
Mucosas hiperémicas	2	7,14%
Lesões dermatológicas	2	7,14%
Mucosas pálidas	2	7,14%
Taquipneia	2	7,14%
Dispneia	2	7,14%
Linfadenomegália	2	7,14%
Febre	2	7,14%
Petéquias	1	3,57%
Sinais de conjuntivite	1	3,57%
Hipotensão	1	3,57%
Hipertensão	1	3,57%

3.5 Hemograma e Análises Bioquímicas

Foram registados os hemogramas de 24 animais e o microhematócrito de um animal. Os achados mais frequentes foram leucocitose com neutrofilia que esteve presente em 17 casos (71%), surgindo neutrofilia sem leucocitose num único caso. Observou-se anemia em 10 casos (40%), sendo esta ligeira em 9 casos (hematócrito entre 30% e 37%) e moderada apenas num (com hematócrito de 25%), trombocitopénia também em 10 casos (42%) e monocitose em 7 (29%). Outros achados menos frequentes de hemograma consistiram em trombocitose com 2 casos (8%), eritrocitose em 2 casos (8%) e linfocitose num caso (4%).

As análises bioquímicas revelaram o aumento da ureia sérica em 26 casos (96%) e de creatinina em 25 (93%), dos 27 casos em que a sua medição foi registada, sendo que o aumento simultâneo dos dois valores (azotémia) identificou-se em 25 casos (93%). Em, pelo menos, 18 animais (75%) foi evidenciada lesão hepática pelo aumento sérico da fosfatase alcalina, medida em 24, e em 15 (65%) pelo aumento sérico de alanina aminotransferase, medida em 23. Dos 20 casos em que a glucose foi medida, 10 (50%) apresentaram hiperglicémia. Dos 6 casos em que a bilirrubina total foi medida, 5 (83%) apresentaram aumento sérico da bilirrubina. Foi medido o fósforo inorgânico em 6 casos, encontrando-se elevado em 4 animais (67%). As proteínas totais foram medidas em 13 casos, encontrando-se aumentadas em apenas 2 cães (15%) e a albumina sérica que foi medida em 17, encontrou-se diminuída em 2 (12%).

Em relação ao ionograma, o sódio foi medido em 16 casos encontrando-se diminuído em 12 (75%), o cloro foi medido em 15, encontrando-se diminuído em 11 (73%), o potássio foi medido em 17 casos estando aumentado em 3 (18%), diminuído em 6 (35%) e normal nos restantes.

3.6 Urianálise

Análise da urina foi realizada em 6 casos (21%), sendo os achados mais frequentes a proteinúria e a glicosúria diagnosticadas em todos (100%) seguidos da hematúria em 4 (14%). A totalidade dos parâmetros de urianálise e respectivas frequências listam-se no quadro 12.

Foi medido o rácio UPC em 2 casos (7%), num dos quais se encontrou aumentado, estando normal no outro.

A urocultura foi realizada em 2 casos (7%), ambos com resultado negativo.

Quadro 12 - Parâmetros de urianálise pesquisados e suas frequências no presente estudo clínico.

Urianálise	Frequência	Porcentagem
Proteinúria	6	100,00%
Glicosúria	6	100,00%
Hematúria	4	66,67%
Isostenúria	1	16,67%
Cilindrúria	1	16,67%
Piúria	1	16,67%
Bilirrubinúria	0	0,00%
Cetonúria	0	0,00%
Cristalúria	0	0,00%
Hipostenúria	0	0,00%

3.7 Imagiologia

Foi realizada ecografia abdominal em 21 dos casos (75%), onde 18 (86%) apresentaram alterações renais, sendo a renomegália a alteração mais frequente surgindo em 9 casos (43%), seguida de hiperecogenicidade do córtex em 6 casos (29%). O *Medulary Rim Sign* esteve presente apenas em 5 casos (24%). Observaram-se alterações hepáticas em 15 animais (71%), como hepatomegália, presente em 10 casos (48%) e hipoecogenicidade difusa, presente em 5 casos (24%). Outras alterações hepáticas como, por exemplo, colangite e nódulos hepáticos, foram observadas em 5 casos (24%). Outros achados de ecografia incluíram esplenomegália, que se detectou em 7 animais (33%) e linfadenomegália inespecífica em 5 (24%). Outros achados como, por exemplo, peritonite e pequena quantidade de líquido livre foram encontrados em 2 casos (10%). Todas as alterações observadas na ecografia abdominal constam no quadro 13.

Quadro 13 – Lista de alterações renais, hepáticas e outras no exame ecográfico abdominal e suas frequências.

Ecografia	Frequência	Porcentagem
Alterações renais	18	85,71%
Renomegália	9	42,86%
Córtex hiperecogénico	6	28,57%
<i>Medullary Rim Sign</i>	5	23,81%
Líquido livre retroperitoneal	3	14,29%
Hiperecogenicidade difusa	3	14,29%
Líquido subcapsular	2	9,52%
Pielectasia	2	9,52%
Perda diferenciação CM	2	9,52%
Calcificação medular	1	4,76%
Alterações hepáticas	15	71,43%
Hepatomegália	10	47,62%
Hipoecogenicidade	5	23,81%
Outro	5	23,81%
Outras alterações	11	52,38%
Esplenomegália	7	33,33%
Linfadenomegália	5	23,81%
Outro	2	9,52%

Foi realizada radiografia torácica em 11 animais (39%), por presença de sinais respiratórios, tendo apresentado todos achados radiográficos compatíveis com hemorragia pulmonar. Outros 6 animais também apresentaram sinais respiratórios durante a hospitalização, embora não tenha sido realizado exame radiológico. Destes, 5 morreram por hemorragia pulmonar aguda e outro foi submetido a eutanásia por contenção de custos.

3.8 Terapêutica e Evolução clínica

Em relação ao tratamento, a ampicilina foi o antibiótico mais utilizado, sendo administrada em 18 animais (64%), seguido da doxiciclina utilizada em 14 animais (50%). A lista de antibióticos utilizados consta no quadro 14. Apenas 4 cães (14%) foram submetidos a terapia

de substituição renal, nomeadamente hemodiálise intermitente e 3 (11%) fizeram corticoterapia a dada altura da hospitalização.

Dos 4 cães que foram submetidos a hemodiálise apenas 2 (50%) sobreviveram, morrendo os restantes 2 por morte natural.

Dos 3 cães que fizeram corticoterapia, 2 apresentaram quadro pulmonar durante a hospitalização, acabando por morrer com hemorragia pulmonar aguda, e 1 não desenvolveu quadro pulmonar e sobreviveu à doença.

Quadro 14 – Lista de antibióticos utilizados no tratamento e sua frequência.

Antibiótico e via de administração	Frequência	Porcentagem
Ampicilina IV	18	64,29%
Doxiciclina PO	14	50,00%
Amoxicilina + Ácido Clavulânico IV	7	25,00%
Enrofloxacina IV	6	21,43%
Metronidazol IV	5	17,86%

A hospitalização durou em média 4,6 dias ($\pm 4,09$), variando de 0 a 19 dias. 17 cães (61%) apresentaram quadro pulmonar durante a hospitalização. Foi registada a alta de 12 cães, correspondendo a uma taxa de sobrevivência de 43% (mortalidade de 57%). Dos animais que não sobreviveram, 7 (44%) foram submetidos a eutanásia e 9 (56%) tiveram baixa por morte natural. A principal causa de morte foi a hemorragia pulmonar, responsável pela morte de 13 cães (81%), 2 animais (13%) foram submetidos a eutanásia pela impossibilidade de prosseguir o tratamento dada a contenção de custos por parte dos proprietários e 1 cão foi submetido a eutanásia devido ao mau prognóstico associado a insuficiência renal grave.

3.9 Indicadores de Prognóstico

Não foi demonstrada diferença significativa na média da idade entre os animais sobreviventes e os não sobreviventes ($p=0,051$). O sexo parece não ter tido qualquer influência no resultado ($p=0,39$).

Tanto os casos de referência como os casos de 1ª e 2ª opinião tiveram o mesmo impacto no desfecho da doença, e as diferenças observadas entre o número de baixas observadas em cada hospital não demonstrou relevância estatística, não se podendo associar um hospital a maior mortalidade.

Nenhum sinal recolhido na anamnese e no exame clínico demonstrou associação com o desfecho da doença.

Em relação aos achados no hemograma, foi encontrada uma associação estatisticamente relevante entre a presença de neutrofilia e a morte com um risco relativo de 4 ($p=0,048$). A trombocitopenia não demonstrou associação com o desenvolvimento de quadro pulmonar durante a hospitalização ($p=0,58$) nem com a morte do animal ($p=0,526$).

Nenhum parâmetro de bioquímica ou de ionograma se associou com o desfecho da doença, nem a presença de alterações na urianálise ou na ecografia.

Encontrou-se associação entre o desenvolvimento de quadro pulmonar durante a hospitalização e a morte do animal com um risco relativo de 4,5 ($p=0,0013$).

Em relação ao tratamento apenas a utilização de doxiciclina foi associada a uma maior sobrevivência, com um risco relativo de 11 ($p=0,00017$).

Foi encontrada uma diferença estatisticamente relevante de 3,6 dias entre a média dos dias de internamento dos animais que sobreviveram (6,67 dias) e dos animais que não sobreviveram (3,06 dias) ($p=0,0004$).

Todos os valores de p encontram-se listados no anexo III, para consulta.

4. Discussão

4.1 Critérios de inclusão

Todos os casos incluídos no estudo foram considerados positivos para a infecção por leptospira e tratados como tal nas unidades hospitalares que os receberam. No entanto, a suposição da infecção baseou-se num conjunto de factores que incluíram critérios clínicos como, por exemplo, o quadro clínico e a presença de lesões na ecografia e critérios epidemiológicos como o acesso ao exterior e o contacto com roedores selvagens. Não foram considerados apenas os critérios laboratoriais que, em muitos casos, não seriam suficientes por si só para o diagnóstico da doença. Por essa razão foram incluídos casos sem a repetição de MAT quando as titulações foram inferiores a 1:800 e casos com medições únicas de IgG no ELISA, organizando-se, em alternativa, os casos por categorias consoante o grau de suspeita da infecção baseadas apenas no diagnóstico laboratorial, na tentativa de credibilizar o estudo e avaliar a eficácia de diagnóstico por parte de cada unidade hospitalar.

4.2 Diagnóstico

O teste de aglutinação microscópica (MAT) é o método de eleição para o diagnóstico sorológico da leptospirose (Greene, 2012; Sykes, 2014; Sykes et al., 2011), tendo sido realizado em apenas 8 casos (29%), no presente estudo clínico. Cães naturalmente infectados apresentam titulações iguais ou superiores a 1:800, o que é presuntivo de leptospirose se for acompanhado de sinais clínicos compatíveis e não houver conhecimento de vacinação recente (Greene, 2012). No entanto, uma única titulação, mesmo que superior a 1:800, não confirma o diagnóstico de leptospirose (Sykes et al., 2011). Na primeira semana de infecção, os cães têm frequentemente resultados de MAT negativos. Como tal, a realização de titulações na fase de convalescença melhora significativamente a sensibilidade e a especificidade no diagnóstico de infecções agudas por MAT. A demonstração de um aumento da titulação de anticorpos no MAT para o quádruplo no espaço de três semanas é, classicamente, necessária para o diagnóstico sorológico definitivo de uma infecção aguda por leptospirose, potencialmente auto limitante. Do mesmo modo, um decréscimo da titulação da mesma magnitude, no curso mais avançado da doença, confirma o diagnóstico da doença (Greene, 2012; Sykes, 2014; Sykes et al., 2011).

No presente estudo clínico não foi possível confirmar nenhum caso de leptospirose com recurso ao MAT, uma vez que não foram quantificadas titulações na fase de convalescença, provavelmente devido ao aumento do custo associado para o diagnóstico da doença. Todos os casos com reacções positivas para outros serogrupos que não os vacinais (canicola e

icterohaemorrhagiae) foram aceites no estudo, com base nos fundamentos apresentados na secção anterior, identificando-se 3 casos de suspeita forte, 4 de suspeita leve e um caso que apresentou baixa titulação no MAT e foi posteriormente confirmado por histopatologia. O serogrupo mais frequente foi o Australis, identificado em 3 casos com baixa titulação e num caso em que não foi possível identificar o verdadeiro serogrupo infectante dada a elevada reactividade para diferentes serogrupos.

As infecções identificadas como mistas neste estudo, não podem, no entanto, ser consideradas verdadeiras infecções mistas. Para tal, seria necessária a obtenção de titulações iguais ou superiores a 1:3200 para mais do que um serogrupo no MAT (Greene, 2012). Contudo, dada a incapacidade de prever qual o serogrupo infectante, os casos em causa foram considerados por conveniência como infecção mista. Devido à reduzida dimensão da amostra de casos nos quais foi realizado o MAT, não é possível aferir conclusões acerca dos serogrupos suspeitos na infecção neste estudo clínico.

Actualmente o Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV) realiza o teste de MAT para a pesquisa de anticorpos leptospirais (Deliberação n.º 607/2015 de 23 de Abril). Dada a falta de divulgação, por parte do INIAV, da oferta deste serviço, muitos Médicos Veterinários recorrem a laboratórios estrangeiros para o diagnóstico da leptospirose com recurso ao MAT. O custo associado ao envio das amostras e o elevado tempo de resposta por parte dos laboratórios estrangeiros podem desencorajar a realização deste teste, considerado o método de eleição para o diagnóstico da doença.

Futuros estudos deverão basear-se na combinação de isolamento, serotipagem e análise genética do agente infeccioso, na tentativa de se conseguir associar um serovar a determinado quadro clínico (Greene, 2012; Sykes et al., 2011)

Com a medição combinada de IgG e IgM, o ELISA é o teste mais apropriado para distinguir a infecção natural da imunidade produzida pela vacinação. Ao contrário das titulações obtidas no MAT e das titulações de IgM, as titulações de IgG aumentam drasticamente após a vacinação e são capazes de persistir por vários meses (Greene, 2012).

Neste estudo clínico, o diagnóstico realizou-se com recurso a ensaios de ELISA em 61% dos casos, sendo o teste mais utilizado para o diagnóstico da doença. Em 5 destes casos (29%), apenas se mediu a titulação de IgG e a sua inclusão no estudo teve por base os fundamentos anteriormente apresentados. Com a medição da titulação de IgG foram categorizados como suspeita moderada 4 casos (titulação \geq 1:800) e 1 caso como suspeita leve (titulação = 1:400), uma vez que não se obteve informação em relação ao estado vacinal dos animais, estes casos foram considerados positivos pela presença de sinais clínicos, sinais ecográficos e risco epidemiológico compatíveis com a doença. Nos restantes casos foram medidas as titulações

de IgG e IgM em paralelo, dos quais 1 caso não mostrou seroconversão, mas cujo diagnóstico foi posteriormente confirmado por PCR. Este fenómeno pode ser explicado se aceitarmos os resultados de estudos experimentais que demonstram que a titulação de IgM aumenta a partir de uma semana após a infecção, atingindo o pico dentro de duas semanas e que o aumento da titulação de IgG desenvolve-se duas a três semanas após a infecção, com a titulação máxima ao final de um mês, aproximadamente (Greene, 2012). Caso o teste sorológico tenha sido realizado na primeira semana de infecção, este não detectaria seroconversão porque o animal ainda não produziu anticorpos suficientes.

Segundo a bibliografia, a utilização de ensaios ELISA sem o recurso a testes adicionais não é recomendada para um correcto diagnóstico (Greene, 2012; Picardeau et al., 2014), como tal os casos diagnosticados por ELISA apenas foram categorizados como suspeita moderada e suspeita leve pois seria necessário outro teste de diagnóstico como o MAT ou o PCR para a um diagnóstico definitivo.

O diagnóstico com recurso a PCR foi realizado em 5 casos (18%) neste estudo clínico.

O PCR detecta a presença de ADN de leptospiros patogénicas em amostras de sangue ou urina, conseguindo-se um rápido diagnóstico da doença. No entanto não foi desenvolvido nenhum ensaio de PCR fiável para a distinção entre serovares e serogrupos (Greene, 2012; Picardeau et al., 2014; Sykes et al., 2011). Os ensaios de PCR têm a potencial vantagem de permitir o diagnóstico no curso precoce da doença, quando os testes sorológicos ainda são negativos e, por outro lado, a história de vacinação não interfere com o diagnóstico de leptospirose por PCR (Midence et al., 2012; Sykes, 2014; Sykes et al., 2011). Podem surgir falsos positivos, sendo que alguns ensaios detectam serovares não patogénicos e todos podem detectar organismos latentes em portadores subclínicos (Greene, 2012). Todos os animais incluídos no estudo apresentavam sinais clínicos, como tal a probabilidade de falsos positivos no PCR foi pequena e os 5 casos nos quais foi realizado PCR foram categorizados como confirmados.

As leptospiros podem ser observadas em microscópio óptico em cortes de tecido com coloração Giemsa ou impregnação com nitrato de prata (método Levaditti) (Greene, 2012). Apesar da escassez de dados em relação à sensibilidade e especificidade da observação microscópica de espiroquetas em cortes de tecido renal, os 2 casos (7%) diagnosticados com recurso a este método foram categorizados como confirmados. A compatibilidade de sinais clínicos, sinais ecográficos e risco epidemiológico associados à presença de grande quantidade de formas compatíveis com leptospira em tecido renal foi aceite, nestas circunstâncias, como suficiente para o diagnóstico definitivo da doença.

Quanto à eficácia de diagnóstico de cada unidade hospitalar incluída no estudo, o HVA foi o hospital com mais casos de leptospirose confirmados, dado ter sido também o hospital que recorreu mais ao PCR para diagnóstico da doença. O HVR foi o hospital com maior número de casos de suspeita leve, porque se incluiu no estudo os casos com titulações <1:800 no MAT, mas foi também o hospital que apresentou casos de suspeita forte, baseados em diagnóstico sorológico e com identificação de serogrupos infectantes suspeitos (MAT). A FMV apresentou apenas casos de suspeita moderada, associados à medição paralela de IgG e IgM, que não permitem um diagnóstico da doença mais conclusivo.

4.3 Epidemiologia

Existe escassa informação epidemiológica recente sobre a leptospirose canina em Portugal, não estando apurada a prevalência ou incidência da doença no país, nem na Grande Área Metropolitana de Lisboa. No presente estudo clínico, houve uma tentativa sem sucesso de apurar a incidência da doença na Grande Área Metropolitana de Lisboa para o período temporal considerado. Não foi possível contabilizar o número total de cães apresentados nas unidades hospitalares incluídas no estudo, devido a dificuldades impostas por limitações dos programas informáticos utilizados nas unidades hospitalares para a gestão das fichas clínicas. A ausência de predisposição racial é consistente com a bibliografia recente e apesar de se ter observado maior incidência de casos em animais adultos (2 a 7 anos), esta ocorreu em animais de todas as faixas etárias, tal como nos estudos publicados (Birnbaum et al., 1998; Greene, 2012; Sykes, 2014). No entanto, um estudo epidemiológico mais aprofundado seria necessário para avaliar o verdadeiro papel do sexo, da idade e da raça como factores de risco da doença. Foi observado maior número de casos nos meses de Março de 2014 e Janeiro de 2015, meses de início de Primavera e de Inverno, respectivamente, no entanto a distribuição dos casos foi relativamente homogénea entre os meses de Outono e Inverno, correspondendo aos meses de maior pluviosidade como sugerem alguns estudos epidemiológicos (Birnbaum et al., 1998; Kikuti et al., 2012; Raghavan et al., 2011) e não ocorreu nenhum caso nos meses de Verão, no entanto quer o tamanho da amostra, quer o período de tempo considerado foram insuficientes para aferir constatações de epidemiologia conclusivas.

4.4 Sinais Clínicos

Nos achados de anamnese a frequência de letargia, anorexia e vômito foi consistente com os estudos publicados recentemente que apresentam respectivamente percentagens de 50 a 100% de letargia, até 84% de anorexia e até 72% de vômito. A poliúria e polidipsia surgiram apenas em 7% dos casos, indo de encontro à informação publicada que apresenta frequências até 50%. Os resultados obtidos em relação à diarreia (18%), à perda de peso (11%) e à fraqueza

muscular (7%) contrastaram, no entanto, com os resultados dos estudos publicados que revelam frequências superiores a 30% para a diarreia, entre 17% e 44% para a perda de peso e entre 39% e 52% para a fraqueza muscular (Birnbaum et al., 1998; Geisen et al., 2007; Goldstein et al., 2006; Kohn et al., 2010). Estas diferenças, principalmente as observadas entre as frequências de fraqueza muscular e perda de peso, podem ser explicadas pelo incompleto preenchimento da ficha clínica por parte do clínico, não sendo registado em suporte informático todos os dados averiguados na anamnese. A fraqueza muscular é um sinal clínico que pode ser confundido com letargia por parte dos proprietários, podendo não ser transmitida ao clínico a presença desse sinal no momento de recolha da anamnese, o que explicaria, em parte, a grande diferença observada com os estudos publicados. A taquipneia foi o único sinal clínico respiratório observado pelos proprietários antes da apresentação em consulta e apresentou-se em apenas 4% dos animais. Quanto à taquipneia e à inapetência, não existem valores de frequência mais exactos publicados para comparação.

Quanto aos achados de exame físico a frequência de desidratação, de dor à palpação abdominal, de mucosas ictéricas e de hipotermia foi consistente com as publicações recentes que descreveram entre 26% e 36% de desidratação, até 36% palpação abdominal dolorosa, entre 10% e 45% de icterícia e entre 6% e 17% de hipotermia. A febre foi apenas observada em 7% dos casos, comparável aos resultados dos estudos publicados que não relatam frequências superiores a 36%. Foi publicado num estudo a presença de linfadenomegália periférica em 19% dos casos, tendo sido identificada em apenas 7% no presente estudo clínico. Foi observada palidez das mucosas em apenas 7% dos casos, contrastando com alguns estudos que relataram a sua presença entre 10% e 22% (Birnbaum et al., 1998; Geisen et al., 2007; Goldstein et al., 2006; Kohn et al., 2010). Mais uma vez estes resultados podem ter sido influenciados pela minuciosidade do clínico no preenchimento das fichas clínicas, podendo algum sinal clínico encontrar-se subvalorizado. Por outro lado foram apenas registados os achados do exame clínico realizado no dia de apresentação do animal em consulta, não se encontrando sempre explícito o momento de recolha destes dados nos estudos consultados para comparação.

Os sinais respiratórios observados no exame físico, no dia de apresentação do animal em consulta, foram a taquipneia (7%), a dispneia (7%) e alterações na auscultação pulmonar (14%), percentagens baixas em comparação com dois estudos recentes que relataram a presença de dispneia no dia de internamento em 62% dos animais e envolvimento pulmonar em 68,8%. No entanto, apesar das baixas percentagens de sinais respiratórios inicialmente, 61% dos animais apresentaram quadro pulmonar (clínico e radiográfico) durante a hospitalização, sendo a hemorragia pulmonar a causa de morte mais frequente (81%), tendo

ocorrido em 46% da totalidade dos casos. Estas frequências aproximam-se mais dos estudos que têm tendencialmente relatado maior número de casos com envolvimento pulmonar na leptospirose canina (Kohn et al., 2010; Major et al., 2014).

Os restantes sinais clínicos observados no exame clínico não demonstraram ser representativos e não existem dados fidedignos publicados para comparação.

4.5 Hemograma e Análises Bioquímicas

As alterações encontradas no hemograma foram consistentes com os publicados em estudos anteriores. A leucocitose está descrita com frequências entre 31% e 81%, a anemia com frequências entre 33% e 53% e a trombocitopenia encontra-se presente entre 14% e 58% dos animais infectados (Birnbaum et al., 1998; Geisen et al., 2007; Goldstein et al., 2006; Kohn et al., 2010). Em relação aos restantes resultados alterados de hemograma identificados neste estudo, não se encontram publicações representativas, nomeadamente a respeito de monocitose, trombocitose, eritrocitose e linfocitose.

A presença de azotémia foi concordante com a frequência sugerida pelos estudos mais recentes que a referem superior a 80% e frequente na apresentação inicial do animal em consulta (Birnbaum et al., 1998; Goldstein et al., 2006; Greene, 2012; Kohn et al., 2010; Sykes, 2014), à excepção de um estudo que descreveu a presença de azotémia em apenas 57% dos animais infectados (Geisen et al., 2007).

Também a percentagem de casos com aumento das enzimas indicadoras de doença hepática foram de encontro ao descrito na bibliografia, entre 56% e 90% no caso da FAS e 33% e 78% no caso da ALT. Estudos apresentam uma frequência de hiperbilirrubinémia entre 17% e 79% e apesar do grau de hiperbilirrubinémia estar associado à gravidade da disfunção hepática, a frequência apresentada neste estudo (83%) pode não ser representativa, uma vez que a bilirrubina total foi medida num número muito reduzido de animais (Birnbaum et al., 1998; Geisen et al., 2007; Goldstein et al., 2006; Greene, 2012; Kohn et al., 2010; Sykes, 2014).

Foi observada hipoalbuminémia em 12% dos animais em que a albumina sérica foi medida, sendo relatada a sua presença em 35% dos casos representados num estudo recente (Goldstein et al., 2006).

A hiperglicémia e a hiperproteinémia estão pouco descritas na leptospirose canina, podendo estar relacionadas com a desidratação observada, ou com outros factores alheios à leptospirose.

A frequência de aumento do fósforo inorgânico sérico não pode ser considerada representativa, uma vez que este foi medido em apenas 6 animais. No entanto, a presença de

hiperfosfatemia pode surgir como reflexo do grau de disfunção renal (Greene, 2012; Sykes, 2014).

Foi diagnosticada hiponatremia em 75%, hipoclorémia em 73% e hipocalémia em 35% dos animais em que o sódio, o cloro e o potássio foram medidos. A presença destas alterações electrolíticas está descrita na leptospirose canina não havendo, no entanto, dados significativos em relação às suas frequências (Greene, 2012; Sykes, 2014). A hipercalémia não está descrita na bibliografia mas foi diagnosticada em 18% dos casos deste estudo em que o potássio foi medido.

4.6 Urianálise

Os achados de urianálise presentes neste estudo corroboram os resultados de publicações recentes que demonstram que as alterações mais frequentes na urianálise e suas frequências são a isostenúria (44%), a hipostenúria, a glicosúria (9 a 82%), a proteinúria (28 a 76%), a piúria (17 a 27%), a cilindrúria (24 a 34%), a hematúria microscópica (27 a 71%) e a bilirrubinúria (Birnbaum et al., 1998; Geisen et al., 2007; Goldstein et al., 2006; Greene, 2012; Kohn et al., 2010; Sykes, 2014). No presente estudo clínico apenas não se observou a bilirrubinúria nem a hipostenúria, estando os restantes resultados descritos na bibliografia. Contudo, a amostra de animais que realizou urianálise é demasiado reduzida para uma análise representativa das frequências obtidas.

O rácio UPC pode encontrar-se aumentado nalguns animais com leptospirose e foi observado em 94% dos animais num estudo recentemente publicado (Greene, 2012; Kohn et al., 2010; Sykes, 2014), contudo este rácio foi apenas realizado em 2 animais no presente estudo clínico e, apesar de num dos casos se encontrar aumentado, não é possível aferir conclusões com base nos dados recolhidos.

Os dois casos em que foi realizada urocultura apresentaram resultados negativos. Não seriam de esperar resultados positivos para leptospirose através da urocultura uma vez que o crescimento das leptospiras é lento, podendo o tempo de incubação das amostras durar de três a seis meses (Sykes, 2014; Sykes et al., 2011). As culturas bacterianas foram realizadas, neste contexto, com o intuito de averiguar a existência de infecção do tracto urinário concomitante, situação que não estaria necessariamente relacionada com a leptospirose.

4.7 Imagiologia

A renomegália foi o achado de ecografia mais frequente, seguido da hiperecogenicidade cortical e da presença de *Medulary Rim Sign*. São sinais anteriormente descritos em animais com leptospirose, assim como a presença de fluído perirenal (subcapsular ou retroperitoneal) e pielectasia (Forrest et al., 1998; Greene, 2012). Também a presença de hepatomegália e

esplenomegália ligeira a moderada estão associadas a leptospirose, mas nenhum dos sinais ecográficos descritos pode ser considerado específico da doença (Sykes, 2014). Os restantes sinais ecográficos como a hiperecogenicidade difusa do rim, perda de diferenciação cortico-medular, calcificação medular, hipocogenicidade hepática e linfadenomegália abdominal não foram associados a leptospirose canina anteriormente, podendo apresentarem-se neste estudo devido à existência de doença concomitante ou destacarem-se pela escassez de estudos orientados para o diagnóstico imagiológico da leptospirose.

Dos 17 animais que desenvolveram quadro pulmonar durante a hospitalização, apenas 11 realizaram radiografia torácica. Os restantes não se encontraram clinicamente estáveis para a realização deste exame.

Todos os animais a quem foi realizada radiografia torácica apresentaram sinais compatíveis com hemorragia pulmonar, padrão intersticial ou alveolar difuso, sinais descritos em estudos recentes sobre o envolvimento pulmonar na leptospirose canina (Greene, 2012; Klopfleisch et al., 2010; Sykes, 2014). Os 6 animais que não realizaram o exame radiológico, muito provavelmente também apresentariam estes sinais radiográficos.

Neste estudo clínico, nenhum animal sem sinais respiratórios realizou exame radiológico. Este facto explica-se facilmente, uma vez que o exame radiográfico não é realizado por rotina nos animais suspeitos de leptospirose. Apesar de estudos sugerirem a existência de um envolvimento pulmonar subclínico comum, baseados em dados radiográficos que demonstram alterações de densidade do interstício pulmonar, este facto não pôde ser constatado neste estudo (Birnbaum et al., 1998).

4.8 Terapêutica e Evolução Clínica

A doxiciclina é eficaz na eliminação das leptospiras do sangue e o fármaco de eleição para a eliminação do estado de portador renal dos animais infectados, sendo o antibiótico recomendado pelo *Consensus Statement* do ACVIM sobre leptospirose canina, quando a medicação oral é tolerada (Sykes et al., 2011; Truccolo et al., 2002). Caso seja necessária uma abordagem parenteral a ampicilina ou a penicilina e os seus derivados são os fármacos de escolha para a eliminação da leptospirose, devendo ser substituída por doxiciclina assim que a medicação oral for possível, para garantir a eliminação das leptospiras do tecido renal (Greene, 2012; Sykes, 2014; Sykes et al., 2011; Truccolo et al., 2002; Watt et al., 1988).

A ampicilina e a doxiciclina foram os antibióticos mais utilizados neste estudo, indicando uma concordância de metodologia com as recomendações actuais sobre o tratamento da doença. Além do mais, foi observada uma associação entre a administração de doxiciclina e a sobrevivência do animal, constatando-se que os animais a quem foi administrado este

antibiótico, apresentaram um aumento da probabilidade de sobrevivência em 1000%, ou seja 11 vezes superior à dos animais nos quais não foi incluída a doxiciclina na antibioterapia. Esta associação pode ser explicada se admitirmos que a maioria dos animais só iniciou a doxiciclina quando começaram a tolerar alimentação oral, o que por sua vez coincide com a fase de recuperação do animal, em que este já não corre risco de vida.

Por outro lado, apenas 64% dos animais fizeram ampicilina. Apesar de não se ter encontrado associação da sua administração com a sobrevivência do animal, o tratamento antimicrobiano deve ser iniciado imediatamente, face à suspeita de leptospirose, mesmo antes da confirmação laboratorial do diagnóstico, sendo que a escolha do antibiótico correcto, como a ampicilina, permite a eliminação rápida da leptospirémia, reduzindo a ocorrência de complicações associadas à infecção (Greene, 2012; Sykes, 2014; Sykes et al., 2011; Truccolo et al., 2002; Watt et al., 1988).

Segundo publicações recentes, mais de 80% dos animais que morreriam das consequências de urémia grave sobrevivem com o acesso a terapia de substituição renal (Sykes et al., 2011). Neste estudo, dos 4 cães que foram submetidos a terapia de substituição renal, apenas 2 sobreviveram. No entanto, dada a pequena dimensão da amostra, é impossível aferir conclusões a partir destes resultados.

Actualmente, o tratamento ideal para cães com síndrome de hemorragia pulmonar leptospiral (LPHS) é ainda desconhecido (Sykes, 2014). Em Medicina Humana foi demonstrada uma diminuição da mortalidade na leptospirose pulmonar associada ao tratamento intravenoso precoce com metilprednisolona (Greene, 2012). No entanto, estudos não revelaram melhoria clínica com a utilização de dexametasona e desmopressina em humanos e em cães com LPHS (Ni wattayakul et al., 2010; Sykes et al., 2011). Neste estudo, apenas 3 animais foram sujeitos a corticoterapia, sendo que apenas 2 apresentavam quadro pulmonar, não tendo o resultado sido favorecido com a administração de corticosteróides. Não foi possível obter conclusões em relação ao efeito da corticoterapia na reversão do quadro pulmonar e na sobrevivência do animal, dada a pequena quantidade de animais aos quais foi administrada esta classe de medicamentos.

Têm sido publicadas várias taxas de sobrevivência associadas à leptospirose canina, que varia sobretudo com a localização geográfica. A taxa de sobrevivência demonstrada neste estudo (43%) é bastante baixa, ainda mais reduzida do que a apresentada por alguns estudos europeus que apresentaram taxas de sobrevivência de 52% e 56,7% (Geisen et al., 2007; Major et al., 2014), já de si reduzidas em comparação com alguns estudos americanos. Outro estudo, de Berlim, que também apresentou taxa elevada de envolvimento pulmonar (70%) obteve uma taxa de sobrevivência substancialmente mais elevada, de 64% (Kohn et al., 2010). Em

Portugal o acesso à terapia de substituição renal, como a hemodiálise, é ainda bastante limitado. O custo associado é a limitação mais frequente e são poucos os locais que oferecem este tipo de tratamento, o que pode estar a contribuir para a reduzida taxa de sobrevivência obtida neste estudo, uma vez que centros com acesso a hemodiálise chegam a exibir taxas de sobrevivência superiores a 80% (Adin & Cowgill, 2000; Sykes et al., 2011).

Foi observado um aumento de 3,6 na média de dias de internamento dos animais que sobreviveram em relação aos animais que não sobreviveram. Por princípio qualquer animal com leptospirose ficará internado até evidência de melhoria do seu estado geral. Mais concretamente, na presença de insuficiência renal aguda, o retorno dos parâmetros bioquímicos renais até valores de referência tendem a demorar 10 a 14 dias quando o tratamento é eficaz (Sykes et al., 2011). Por outro lado, a alta deve ser ponderada apenas após o início do tratamento oral com doxiciclina, altura a partir da qual começam a ser eliminadas leptospiras do parênquima renal (Truccolo et al., 2002). É, como tal, compreensível que haja uma elevada média de hospitalização no grupo de animais sobreviventes, dada também a clássica apresentação aguda da doença, principalmente neste estudo onde a principal causa de morte foi a hemorragia pulmonar aguda.

4.9 Indicadores de Prognóstico

A trombocitopenia é aceite como um marcador de mau prognóstico, sendo o seu grau correlacionável com a gravidade do quadro respiratório e consequente mortalidade em cães (Greene, 2012; Kohn et al., 2010). No entanto, no presente estudo não foi observada uma associação entre a presença de trombocitopenia e o desenvolvimento de um quadro pulmonar durante a hospitalização, nem com a mortalidade. Este facto pode ser explicado por uma provável sobrevalorização da trombocitopenia real, dada a pouca prática de confirmação por esfregaço sanguíneo. Erros na técnica de recolha de amostras sanguíneas podem estar na origem de trombocitopenias irreais, devido à formação de coágulo no interior do tubo de amostra. Por outro lado, os dados de hemograma foram apenas recolhidos na apresentação inicial do animal em consulta, não tendo sido registado caso tenha surgido trombocitopenia mais tarde, no decorrer da hospitalização.

Um estudo recente identificou a presença de valores de rácio UPC significativamente superiores no grupo de animais que não sobreviveram a infecção por leptospirose, comparativamente ao grupo de sobreviventes da mesma doença. Foi, como tal, sugerido como indicador de mau prognóstico na leptospirose canina, nessa publicação (Mastrorilli et al., 2007). No presente estudo clínico, não foi possível avaliar essa associação, dado que apenas dois animais realizaram a medição do rácio UPC. Todavia, um dos casos apresentou rácio

UPC significativamente elevado no momento de medição, tendo sido o animal submetido a eutanásia, posteriormente, dado o grave compromisso renal.

Foi observada, no entanto, uma associação entre a presença de quadro pulmonar e a mortalidade, podendo-se afirmar que os animais incluídos neste estudo que desenvolveram quadro pulmonar durante a hospitalização apresentaram um aumento de probabilidade de 350% de morrer, ou seja, 4,5 vezes mais, em comparação com os animais que não desenvolveram quadro pulmonar.

A presença de neutrofilia no dia de apresentação do animal em consulta foi associada a um aumento da probabilidade da morte do animal em 300%, ou seja, 4 vezes superior aos animais que não apresentam neutrofilia no dia de apresentação inicial. Alguns estudos em Medicina Humana sugerem a elevada contagem leucocitária como um indicador de mortalidade (Greene, 2012; Rajapakse et al., 2010). Todavia, em Medicina Veterinária nenhum estudo desenvolvido apresentou resultados semelhantes referentes ao leucograma. No presente estudo clínico não foi contabilizado o valor absoluto da contagem de leucócitos e neutrófilos; apenas foi registado, para cada caso, se a contagem leucocitária ou neutrofílica se encontravam no intervalo de referência ou eram superiores a este, no dia em que os animais se apresentaram à consulta. Atendendo a estas condições, não se pode aferir que quanto maior o grau de neutrofilia maior o risco de mortalidade, nem se pode concluir que o desenvolvimento de neutrofilia durante a hospitalização também apresente uma associação com a mortalidade.

IV - Conclusão

Até à data são escassos os estudos sobre leptospirose canina realizados em Portugal. O último estudo de relevância epidemiológica remonta ao ano de 1992, onde apenas a região do Alto Douro foi analisada. Por não se tratar de uma doença de declaração obrigatória em Medicina Veterinária, não existem dados oficiais relativos a prevalência e incidência anual da doença em canídeos em Portugal, nem se encontra descrito o quadro clínico mais observado e a abordagem da doença pelos clínicos portugueses. Neste contexto, apesar da incapacidade de apurar a incidência da doença, o presente estudo clínico apresenta-se como um contributo útil para o estudo da leptospirose canina no país.

Apenas 25% dos casos representados no estudo foram considerados confirmados com base laboratorial. Este resultado reflecte a incapacidade das unidades hospitalares, aqui representadas, de apresentar um diagnóstico definitivo. O desconhecimento sobre o método de confirmação laboratorial mais eficaz, aliado às limitações financeiras impostas pelos proprietários é, provavelmente, o principal responsável pela baixa percentagem de casos confirmados. Por outro lado, tendo em conta a elevada utilização de ensaios ELISA como recurso para o diagnóstico laboratorial da leptospirose canina, é provável que a doença se encontre subdiagnosticada.

Poucas são as conclusões obtidas com os resultados epidemiológicos deste estudo clínico. Apresentaram-se mais canídeos de raça indeterminada, demonstrando uma ausência de predisposição racial, maior número de casos nos meses de Outono e Inverno e, apesar de o serogrupo Australis se apresentar como o suspeito infectante predominante, a dimensão da amostra não permitiu concluir o seu papel real na epidemiologia da doença na Grande Área Metropolitana de Lisboa.

À semelhança com o descrito na bibliografia os principais sinais clínicos associados à leptospirose foram o vómito (71%), a letargia (68%), a anorexia (57%) e a inapetência (36%). A leucocitose com neutrofilia esteve presente na maioria dos casos (71%), estando a neutrofilia associada a um aumento de 4 vezes do risco de mortalidade. Menos de metade dos casos apresentou anemia (40%) e trombocitopenia (42%), não estando esta última associada com maior mortalidade, ao contrário do descrito em publicações anteriores.

Em 93% dos casos observou-se azotemia, evidenciando lesão renal, e observou-se lesão hepática em pelo menos 75% dos animais com aumento das FAS e 65% com aumento da ALT, concluindo-se que mais de metade dos doentes apresentaram quadro renal e hepático em simultâneo.

Apesar de sugerido um indicador de prognóstico pela bibliografia, este estudo não conseguiu associar o rácio UPC com a mortalidade, dado o reduzido tamanho da amostra.

Mais de metade dos casos apresentaram alterações renais e hepáticas na ecografia, sendo a hepatomegália a alteração mais frequente (48%), seguida da renomegália (43%), hiperecogenicidade do córtex renal (29%), *Medulary Rim Sign* (24%) e hipoeogenicidade do parênquima hepático (24%).

A ampicilina e a doxiciclina foram os antibióticos mais utilizados nos casos descritos neste estudo, concluindo-se existir uma concordância com as recomendações actuais sobre o tratamento antimicrobiano da leptospirose canina por parte das unidades hospitalares envolvidas. Foi, igualmente, identificada uma associação relevante entre a administração de doxiciclina e a alta do animal, facilmente explicada se admitirmos que os animais apenas iniciam a doxiciclina, administrada por via oral, numa fase de recobro, quando já não apresentam risco de vida.

Identificou-se uma média de 4,6 dias ($\pm 4,09$) no tempo de hospitalização com uma diferença significativa de 3,6 dias no tempo de internamento entre os animais sobreviventes e os não sobreviventes, interpretada como natural a necessidade dum elevado tempo de hospitalização no período de recobro do animal, quer por motivos de monitorização clínica, quer por razões de saúde pública.

Apesar de não se tratar de uma apresentação da leptospirose canina habitualmente reconhecida pelos Médicos Veterinários portugueses, o presente estudo demonstrou um elevado envolvimento de quadro pulmonar (61%) durante a hospitalização. Este resultado foi fortemente associado à mortalidade da doença (aumento do risco em 4,5 vezes) e vai de encontro a alguns estudos mais recentes, que referem um aumento crescente desta apresentação clínica da doença na Europa.

Foi demonstrada uma taxa de sobrevivência de 43%, taxa baixa comparativamente aos estudos publicados até à data, identificando-se a hemorragia pulmonar como a principal causa de morte (81%), tendo ocorrido em 46% da totalidade dos casos.

Para um estudo aprofundado e mais completo da epidemiologia da leptospirose canina na Grande Área Metropolitana de Lisboa, seria necessária a recolha serológica de uma amostra mais representativa da população canina da área geográfica. Não foi avaliada a relação exposição-infecção neste estudo com recurso ao MAT, que forneceria informação de elevado interesse epidemiológico, nem os critérios de inclusão permitiram a obtenção de conclusões nesse sentido. Seria de igual interesse a avaliação da exposição dos cães em estudo a factores de risco, através da obtenção de informação relativa aos hábitos de actividade do animal, avaliação da seroprevalência de *Leptospira*, com recurso a MAT, nos animais silváticos da

área geográfica, nomeadamente os roedores e pesquisa de leptospiros nas fontes e reservatórios naturais de água. A identificação dos hospedeiros reservatório e dos serogrupos de *Leptospira* circulantes forneceria dados úteis relativos ao risco de exposição na Grande Área Metropolitana de Lisboa.

Este estudo, primariamente orientado para a descrição fisiopatológica da doença e pesquisa de indicadores de prognóstico, tem como principais limitações a dificuldade na recolha de mais informação relativamente a esfregaço sanguíneo, parâmetros bioquímicos, urianálise, rácio UPC, ecografia e radiografia torácica que resultou na apresentação de amostras demasiado reduzidas para a obtenção de resultados mais conclusivos.

Sugere-se, para um estudo de objectivo semelhante, a colecção de um maior número de casos, relativos a um período temporal mais alargado e a utilização de critérios de inclusão restritos apenas aos casos confirmados ou fortemente suspeitos, com base num resultado de PCR positivo, duas titulações consecutivas de MAT, demonstrando o aumento ou a diminuição da titulação para o quádruplo, uma titulação igual ou superior a 1:800 no MAT, associada a presença de sinais clínicos compatíveis, ou a observação de leptospiros em preparações histológicas. Aconselha-se também a padronização da recolha da anamnese e dos sinais de exame clínico, para minimizar a falta de informação referente a estes campos, secundária a erro humano.

Para uma futura pesquisa de indicadores de prognóstico, na continuidade deste estudo clínico, seria de elevado interesse averiguar o valor do grau de neutrofilia e, possivelmente, da sua evolução noutra fase do internamento, como eventual indicador da mortalidade em cães com leptospirose.

V - Bibliografia

- Adin, C. A., & Cowgill, L. D. (2000). Treatment and outcome of dogs with leptospirosis: 36 cases (1990-1998). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 216(3), 371–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10668536>
- Adler, B., Lo, M., Seemann, T., & Murray, G. L. (2011). Pathogenesis of leptospirosis: the influence of genomics. *Veterinary Microbiology*, 153(1-2), 73–81. doi:10.1016/j.vetmic.2011.02.055
- Adler, B., & Peña Moctezuma, A. (2010). Leptospira and leptospirosis. *Veterinary Microbiology*, 140(3-4), 287–96. doi:10.1016/j.vetmic.2009.03.012
- André-Fontaine, G. (2006). Canine leptospirosis--do we have a problem? *Veterinary Microbiology*, 117(1), 19–24. doi:10.1016/j.vetmic.2006.04.005
- Binder, W. D., & Mermel, L. A. (1998). Leptospirosis in an urban setting: case report and review of an emerging infectious disease. *The Journal of Emergency Medicine*, 16(6), 851–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9848699>
- Birnbaum, N., Barr, S. C., Center, S. A., Schermerhorn, T., Randolph, J. F., & Simpson, K. W. (1998). Naturally acquired leptospirosis in 36 dogs: serological and clinicopathological features. *Journal of Small Animal Practice*, 39(5), 231–236. doi:10.1111/j.1748-5827.1998.tb03640.x
- Burth, P., Younes-Ibrahim, M., Santos, M. C. B., Castro-Faria Neto, H. C., & de Castro Faria, M. V. (2005). Role of nonesterified unsaturated fatty acids in the pathophysiological processes of leptospiral infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 191(1), 51–7. doi:10.1086/426455
- Cerqueira, G. M., & Picardeau, M. (2009). A century of Leptospira strain typing. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 9(5), 760–8. doi:10.1016/j.meegid.2009.06.009
- Collares-Pereira, M. (1992). *Contribuição para o estudo do género Leptospira em Portugal*. Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia.
- Day, M. J., Horzinek, M. C., & Schultz, R. D. (2010). WSAVA Guidelines for the Vaccination of Dogs and Cats. *Journal of Small Animal Practice*, 51(6), 338–356. doi:10.1111/j.1748-5827.2010.00959.x
- De Zoysa, J. R. (2004). Cardiac troponins and renal disease. *Nephrology (Carlton, Vic.)*, 9(2), 83–8. doi:10.1111/j.1440-1797.2003.00235.x
- Dey, S., Mohan, C., Kumar, T., Ramadass, P., Nainar, A., & Nachimuthu, K. (2004). Recombinant LipL32 antigen-based single serum dilution ELISA for detection of canine leptospirosis. *Veterinary Microbiology*, 103(1-2), 99–106. doi:10.1016/j.vetmic.2004.07.018

- Direcção Geral da Alimentação e Veterinária. (2015). *Medicamentos veterinários autorizados*. Lisboa: DGAV.
- Direcção-Geral da Saúde. (2007). *Doenças de Declaração Obrigatória 2002-2006*. Lisboa: Ministério da Saúde.
- Direcção-Geral da Saúde. (2014). *Doenças de declaração obrigatória 2009-2012 (Vol. I)*. Lisboa: Ministério da Saúde.
- Ellis, W. A. (2010). Control of canine leptospirosis in Europe: time for a change? *The Veterinary Record*, *167*(16), 602–5. doi:10.1136/vr.c4965
- Esteves, L. M., Bulhões, S. M., Branco, C. C., Mota, F. M., Paiva, C., Cabral, R., ... Mota-Vieira, L. (2014). Human leptospirosis: seroreactivity and genetic susceptibility in the population of São Miguel Island (Azores, Portugal). *PloS One*, *9*(9), e108534. doi:10.1371/journal.pone.0108534
- Ettinger, S. J., & Feldman, E. C. (2010). *Veterinary Internal Medicine (7th ed.)*. Missouri: Saunders Elsevier.
- Forrest, L. J., O'Brien, R. T., Tremeling, M. S., Steinberg, H., Cooley, A. J., & Kerlin, R. L. (1998). Sonographic renal findings in 20 dogs with leptospirosis. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, *39*(4), 337–340. doi:10.1111/j.1740-8261.1998.tb01617.x
- 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). *The Journal of Small Animal Practice*, *48*(6), 324–8. doi:10.1111/j.1748-5827.2007.00324.x
- Goldstein, R. E., Lin, R. C., Langston, C. E., Scrivani, P. V., Erb, H. N., & Barr, S. C. (2006). Influence of infecting serogroup on clinical features of leptospirosis in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, *20*(3), 489–94. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16734079>
- Greene, C. E. (2012). *Infectious diseases of the dog and cat (4th ed.)*. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.
- Haake, D. A., Dundoo, M., Cader, R., Kubak, B. M., Hartskeerl, R. A., Sejvar, J. J., & Ashford, D. A. (2002). Leptospirosis, Water Sports, and Chemoprophylaxis. *Clinical Infectious Diseases*, *34*, e40–43.
- Haake, D., Chao, G., Zuerner, R., Barnett, J., Barnett, D., Mazel, M., ... Bolin, C. (2000). The Leptospiral Major Outer Membrane Protein LipL32 Is a Lipoprotein Expressed during Mammalian Infection. *Infection and Immunity*, *68*(4), 2276–2285. doi:10.1128/IAI.68.4.2276-2285.2000
- Kikuti, M., Langoni, H., Nobrega, D., Corrêa, A., & Ullmann, L. (2012). Occurrence and risk factors associated with canine leptospirosis. *The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, *18*(1), 124–127.
- Klaasen, H. L. B. M., Molkenboer, M. J. C. H., Vrijenhoek, M. P., & Kaashoek, M. J. (2003). Duration of immunity in dogs vaccinated against leptospirosis with a bivalent inactivated

vaccine. *Veterinary Microbiology*, 95(1-2), 121–32. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12860082>

- Klopfleisch, R., Kohn, B., Plog, S., Weingart, C., Nöckler, K., Mayer-Scholl, A., & Gruber, A. D. (2010). An emerging pulmonary haemorrhagic syndrome in dogs: similar to the human leptospiral pulmonary haemorrhagic syndrome? *Veterinary Medicine International*, 2010, 928541. doi:10.4061/2010/928541
- Kohn, B., Steinicke, K., Arndt, G., Gruber, A. D., Guerra, B., Jansen, A., ... Nöckler, K. (2010). Pulmonary abnormalities in dogs with leptospirosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 24(6), 1277–82. doi:10.1111/j.1939-1676.2010.0585.x
- Lança, S. I. O. (2011). *Contribuição para o estudo da leptospirose canina em Portugal*. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Faculdade de Medicina Veterinária.
- Lau, C., Smythe, L., & Weinstein, P. (2010). Leptospirosis: an emerging disease in travellers. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 8(1), 33–9. doi:10.1016/j.tmaid.2009.12.002
- Levett, P. N. (2001). Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(2), 296–326. doi:10.1128/CMR.14.2.296-326.2001
- Levett, P. N. (2003). Usefulness of Serologic Analysis as a Predictor of the Infecting Serovar in Patients with Severe Leptospirosis. *Clinical Infectious Diseases*, 36, 447–52.
- Major, A., Schweighauser, A., & Francey, T. (2014). Increasing incidence of canine leptospirosis in Switzerland. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(7), 7242–60. doi:10.3390/ijerph110707242
- Mastrorilli, C., Dondi, F., Agnoli, C., Turba, M. E., 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). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21(1), 3–10. doi:10.1111/j.1939-1676.2007.tb02921.x
- Matoon, J. S., & Nyland, T. G. (2015). *Small animal diagnostic ultrasound* (3rd ed.). Missouri: Saunders Elsevier.
- Midence, J. N., Leutenegger, C. M., Chandler, A. M., & Goldstein, R. E. (2012). Effects of recent *Leptospira* vaccination on whole blood real-time PCR testing in healthy client-owned dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 26(1), 149–52. doi:10.1111/j.1939-1676.2011.00852.x
- Minke, J. M., Bey, R., Tronel, J. P., Latour, S., Colombet, G., Yvarel, J., ... Guigal, P. M. (2009). Onset and duration of protective immunity against clinical disease and renal carriage in dogs provided by a bi-valent inactivated leptospirosis vaccine. *Veterinary Microbiology*, 137(1-2), 137–45. doi:10.1016/j.vetmic.2008.12.021
- Monahan, A. M., Miller, I. S., & Nally, J. E. (2009). Leptospirosis: risks during recreational activities. *Journal of Applied Microbiology*, 107(3), 707–16. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04220.x

- Niwattayakul, K., Kaewtasi, S., Chueasuwanhai, S., Hoontrakul, S., Chareonwat, S., Suttinont, C., ... Suputtamongkol, Y. (2010). An open randomized controlled trial of desmopressin and pulse dexamethasone as adjunct therapy in patients with pulmonary involvement associated with severe leptospirosis. *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 16(8), 1207–12. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.03037.x
- Oliveira, D. S. C., Guimarães, M. J. B., Portugal, J. L., & Medeiros, Z. (2009). The socio-demographic, environmental and reservoir factors associated with leptospirosis in an urban area of north-eastern Brazil. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 103(2), 149–57. doi:10.1179/136485909X398221
- Panaphut, T., Domrongkitchaiporn, S., Vibhagool, A., Thinkamrop, B., & Susaengrat, W. (2003). Ceftriaxone compared with sodium penicillin G for treatment of severe leptospirosis. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 36(12), 1507–13. doi:10.1086/375226
- Phimda, K., Hoontrakul, S., Suttinont, C., Chareonwat, S., Losuwanaluk, K., Chueasuwanhai, S., ... Suputtamongkol, Y. (2007). Doxycycline versus azithromycin for treatment of leptospirosis and scrub typhus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(9), 3259–63. doi:10.1128/AAC.00508-07
- Picardeau, M., Bertherat, E., Jancloes, M., Skouloudis, A. N., Durski, K., & Hartskeerl, R. A. (2014). Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: current tools and emerging technologies. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 78(1), 1–8. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2013.09.012
- Raghavan, R. K., Brenner, K., Higgins, J., Van der Merwe, D., & Harkin, K. R. (2011). Evaluations of land cover risk factors for canine leptospirosis: 94 cases (2002-2009). *Preventive Veterinary Medicine*, 101(3-4), 241–9. doi:10.1016/j.prevetmed.2011.05.010
- Raghavan, R. K., Brenner, K. M., Higgins, J. J., Hutchinson, J. M., & Harkin, K. R. (2012a). Evaluations of hydrologic risk factors for canine leptospirosis: 94 cases (2002-2009). *Preventive Veterinary Medicine*, 107(1-2), 105–9. doi:10.1016/j.prevetmed.2012.05.004
- Raghavan, R. K., Brenner, K. M., Higgins, J. J., Hutchinson, J. M., & Harkin, K. R. (2012b). Neighborhood-level socioeconomic and urban land use risk factors of canine leptospirosis: 94 cases (2002-2009). *Preventive Veterinary Medicine*, 106(3-4), 324–31. doi:10.1016/j.prevetmed.2012.04.003
- Rajapakse, S., Rodrigo, C., & Haniffa, R. (2010). Developing a clinically relevant classification to predict mortality in severe leptospirosis. *Journal of Emergencies, Trauma, and Shock*, 3(3), 213–9. doi:10.4103/0974-2700.66519
- Ramsey, I. (2014). *Small animal formulary* (8th ed.). Gloucester: British Small Animal Veterinary Association.
- Ross, L., Jakowski, R., Bolin, C., & Kiupel, M. (2011). Retrospective immunohistochemical detection of *Leptospira* in dogs with renal pathology. *The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 9(4), 324–330.

- Scanziani, E., Origgi, F., Giusti, A. M., Iacchia, G., Vasino, A., Pirovano, G., ... Tagliabue, S. (2002). Serological survey of leptospiral infection in kennelled dogs in Italy. *Journal of Small Animal Practice*, 43(4), 154–157. doi:10.1111/j.1748-5827.2002.tb00048.x
- Sessions, J. K., & Greene, C. E. (2004a). Canine leptospirosis: epidemiology, pathogenesis, and diagnosis. *Compendium*, (August), 606–623.
- Sessions, J. K., & Greene, C. E. (2004b). Canine leptospirosis: treatment, prevention, and zoonosis. *Compendium*, (September), 700–708.
- Sonrier, C., Branger, C., Michel, V., Ruvoën-Clouet, N., Ganière, J. P., & André-Fontaine, G. (2000). Evidence of cross-protection within *Leptospira interrogans* in an experimental model. *Vaccine*, 19(1), 86–94. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10924790>
- Speidel, A., Faísca, R., Fernandes, C., Vieira, A., Barros, M. S. J., Valente, C., ... Correia, L. (2008). Leptospire - casuística do Serviço de Infeciologia do Centro Hospitalar de Coimbra 1990-2007. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas*, 4(2), 57 – 62.
- Srikram, A., Zhang, K., Bartpho, T., Lo, M., Hoke, D. E., Sermswan, R. W., ... Murray, G. L. (2011). Cross-protective immunity against leptospirosis elicited by a live, attenuated lipopolysaccharide mutant. *The Journal of Infectious Diseases*, 203(6), 870–9. doi:10.1093/infdis/jiq127
- Stern, E. J., Galloway, R., Shadomy, S. V, Wannemuehler, K., Atrubin, D., Blackmore, C., ... Clark, T. A. (2010). Outbreak of leptospirosis among Adventure Race participants in Florida, 2005. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 50(6), 843–9. doi:10.1086/650578
- Strugnell, B. W., Featherstone, C., Gent, M., Lister, P., Evans, G., Okereke, E., ... Pritchard, G. (2009). Weil's disease associated with the adoption of a feral rat. *The Veterinary Record*, 164(6), 186. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19202179>
- Suputtamongkol, Y., Pongtavornpinyo, W., Lubell, Y., Suttinont, C., Hoontrakul, S., Phimda, K., ... Day, N. (2010). Strategies for diagnosis and treatment of suspected leptospirosis: a cost-benefit analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(2), e610. doi:10.1371/journal.pntd.0000610
- Sykes, J. E. (2014). *Canine and feline infectious diseases*. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.
- Sykes, J. E., Hartmann, K., Lunn, K. F., Moore, G. E., Stoddard, R. A., & Goldstein, R. E. (2011). 2010 ACVIM small animal consensus statement on leptospirosis: diagnosis, epidemiology, treatment, and prevention. *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 25(1), 1–13. doi:10.1111/j.1939-1676.2010.0654.x
- Tochetto, C., Flores, M. M., Kommers, G. D., Barros, C. S. L., & Figuera, R. A. (2012). Aspectos anatomopatológicos da leptospireose em cães: 53 casos (1965-2011). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 32(5), 430–443.

- Trivedi, S. V., Vasava, A. H., Bhatia, L. C., Patel, T. C., Patel, N. K., & Patel, N. T. (2010). Plasma exchange with immunosuppression in pulmonary alveolar haemorrhage due to leptospirosis. *The Indian Journal of Medical Research*, *131*, 429–33. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20418558>
- Trivedi, S. V., Vasava, A. H., Patel, T. C., & Bhatia, L. C. (2009). Cyclophosphamide in pulmonary alveolar hemorrhage due to leptospirosis. *Indian Journal of Critical Care Medicine : Peer-Reviewed, Official Publication of Indian Society of Critical Care Medicine*, *13*(2), 79–84. doi:10.4103/0972-5229.56053
- Truccolo, J., Charavay, F., Merien, F., & Perolat, P. (2002). Quantitative PCR assay to evaluate ampicillin, ofloxacin, and doxycycline for treatment of experimental leptospirosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *46*(3), 848–53. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=127490&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Vieira, M. L., Gama-Simões, M. J., & Collares-Pereira, M. (2006). Human leptospirosis in Portugal: A retrospective study of eighteen years. *International Journal of Infectious Diseases : IJID : Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*, *10*(5), 378–86. doi:10.1016/j.ijid.2005.07.006
- Watt, G., Linda Tuazon, M., Santiago, E., Padre, L., Calubaquib, C., Ranoa, C., & Laughlin, L. (1988). Placebo-controlled trial of intravenous penicillin for severe and late leptospirosis. *The Lancet*, *331*(8583), 433–435. doi:10.1016/S0140-6736(88)91230-5
- Wild, C. J., Greenlee, J. J., Bolin, C. A., Barnett, J. K., Haake, D. A., & Cheville, N. E. (2002). An improved immunohistochemical diagnostic technique for canine leptospirosis using antileptospiral antibodies on renal tissue. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation : Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, *14*(1), 20–4. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2666280&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Wuthiekanun, V., Chierakul, W., Limmathurotsakul, D., Smythe, L., Symonds, M., Dohnt, M., ... Peacock, S. (2007). Optimization of Culture of *Leptospira* from Humans with Leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology*, *45*(4), 1363–1365. doi:10.1128/JCM.02430-06
- Xu, C., Loftis, A., Ahluwalia, S., 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), e89507. doi:10.1371/journal.pone.0089507

VI – Anexos

Anexo I – Formulário para a recolha dos dados analisados no estudo clínico.

Figura 12 – Página 1 do formulário para a recolha dos dados analisados no estudo clínico.

Leptospirose - Descrição de caso

Nº do Caso <input type="text"/>	Sexo <input type="text"/>	Raça <input type="text"/>
Nome do Animal <input type="text"/>	Estado <input type="text"/>	Data de Nascimento <input type="text"/>
Hospital <input type="text"/>	<input type="checkbox"/> Referência <input type="checkbox"/> 2ª opinião	Idade <input type="text"/>
		Data de Apresentação <input type="text"/>

Diagnóstico

Situação <input type="text"/>		
MAT <input type="text"/>	Serogrupo <input type="text"/>	Titulação mais elevada <input type="text"/>
ELISA <input type="text"/>	Seroconversão <input type="text"/>	Titulação <input type="text"/>
PCR <input type="text"/>	Resultado <input type="text"/>	
Histopatologia <input type="text"/>	Resultado <input type="text"/>	

Anamnese

<input type="checkbox"/> Letargia	<input type="checkbox"/> Diarreia	<input type="checkbox"/> Fraqueza	<input type="checkbox"/> Inapetência	<input type="checkbox"/> Anorexia
<input type="checkbox"/> Vômito	<input type="checkbox"/> Polidípsia	<input type="checkbox"/> Poliúria	<input type="checkbox"/> Perda de Peso	<input type="checkbox"/> Taquipneia

Exame Clínico

<input type="checkbox"/> Desidratação	<input type="checkbox"/> Palpação abdominal dolorosa	<input type="checkbox"/> Auscultação pulmonar alterada
<input type="checkbox"/> Febre	<input type="checkbox"/> Linfadenomegália	<input type="checkbox"/> Dispneia
<input type="checkbox"/> Hipotermia	<input type="checkbox"/> Hipertensão	<input type="checkbox"/> Taquipneia
<input type="checkbox"/> Mucosas pálidas	<input type="checkbox"/> Hipotensão	<input type="checkbox"/> Sinais de conjuntivite
<input type="checkbox"/> Mucosas ictéricas	<input type="checkbox"/> Taquicárdia	<input type="checkbox"/> Lesões dermatológicas
<input type="checkbox"/> Mucosas hiperémicas	<input type="checkbox"/> Petéquias	

Hemograma

Anemia	<input type="text"/>	Linfopénia	<input type="text"/>
Eritrocitose	<input type="text"/>	Monocitose	<input type="text"/>
Leucocitose	<input type="text"/>	Trombocitopénia	<input type="text"/>
Neutrofilia	<input type="text"/>	Trombocitose	<input type="text"/>
Linfocitose	<input type="text"/>		

Figura 13 - Página 2 do formulário para a recolha dos dados analisados no estudo clínico.

Bioquímicas	
Ureia	<input type="text"/>
Crea	<input type="text"/>
FAS	<input type="text"/>
ALT	<input type="text"/>
PT	<input type="text"/>
Alb	<input type="text"/>
Glu	<input type="text"/>
IP	<input type="text"/>
Tbil	<input type="text"/>

Ionograma	
Na	<input type="text"/>
Cl	<input type="text"/>
K	<input type="text"/>

Urianálise		
Fez urianálise?	<input type="text"/>	
Racio UPC	<input type="text"/>	
Fez urocultura?	<input type="text"/>	
Resultado	<input type="text"/>	
<input type="checkbox"/> Isostenúria	<input type="checkbox"/> Proteinúria	<input type="checkbox"/> Cetonúria
<input type="checkbox"/> Hipostenúria	<input type="checkbox"/> Glucosúria	<input type="checkbox"/> Piúria
	<input type="checkbox"/> Hematúria	<input type="checkbox"/> Cilindrúria
	<input type="checkbox"/> Bilirrubinúria	<input type="checkbox"/> Cristalúria

Ecografia	
Fez ecografia?	<input type="text"/>
Eco renal normal?	<input type="text"/>
Eco hepática normal?	<input type="text"/>
Restante eco normal?	<input type="text"/>
<input type="checkbox"/> Renomegália	<input type="checkbox"/> Córtex hiperecogénico
<input type="checkbox"/> Rim Medulary Sign	<input type="checkbox"/> Perda diferenciação CM
<input type="checkbox"/> Hiperecogenicidade difusa	<input type="checkbox"/> Pielectasia
<input type="checkbox"/> Calcificação medular	<input type="checkbox"/> Fluido retroperitoneal
<input type="checkbox"/> Fluido subcapsular	<input type="checkbox"/> Outro
<input type="checkbox"/> Hepatomegália	<input type="checkbox"/> Hipoecogenicidade
<input type="checkbox"/> Hiperecogenicidade	<input type="checkbox"/> Outro
<input type="checkbox"/> Esplenomegália	<input type="checkbox"/> Outro
<input type="checkbox"/> Linfadenomegália	

Figura 14 - Página 3 do formulário para a recolha dos dados analisados no estudo clínico.

Radiografia Torácica	
Fez radiografia torácica?	<input type="text"/>
Sinais compatíveis com hemorragia pulmonar?	<input type="text"/>

Tratamento		
<input type="checkbox"/> Ampicilina	<input type="checkbox"/> Doxiciclina	<input type="checkbox"/> Amoxicilina + Ac Clav
<input type="checkbox"/> Enrofloxacina	<input type="checkbox"/> Metronidazol	
Corticoterapia?	<input type="text"/>	
Terapia de substituição renal?	<input type="text"/>	

Resultado			
Duração da hospitalização (dias)	<input type="text"/>		
Quadro pulmonar durante hospitalização?	<input type="text"/>		
Alta?	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/> Morte Natural	<input type="checkbox"/> Eutanásia
Causa de morte	<input type="text"/>		

Anexo II – Listagem dos dados obtidos pelo preenchimento dos formulários, para análise no estudo clínico.

Quadro 15 – Página 1 da listagem de dados obtidos pelo preenchimento do formulário.

ID	Nome do Animal	Raça	Sexo	Estado	Data de Nascimento	Idade	Data de Apresentação	Hospital	Referência	2ª opinião	Situação	MAT
1	Veneza	indeterminada	fêmea	fértil	22-09-2011	3	22-01-2014	HVA	No	No	Suspeita moderada	No
2	Chico	Labrador	macho	fértil	01-03-2003	9	13-03-2014	HVA	No	No	Confirmado	No
3	Scott	Pastor Alemão	macho	fértil	19-04-2010	4	17-03-2014	HVA	No	No	Suspeita leve	No
4	Lira	indeterminada	fêmea	ovariohisterectomia	01-01-2006	8	19-03-2014	HVA	No	No	Suspeita moderada	No
5	Boris	Golden Retriever	macho	fértil	21-04-2003	11	13-05-2014	HVA	Yes	No	Suspeita moderada	No
6	Lua	indeterminada	fêmea	ovariohisterectomia	13-05-2005	9	26-10-2014	HVA	No	No	Confirmado	No
7	Yoshi	Dálmata	macho	fértil	01-11-2007	7	15-11-2014	HVA	No	No	Suspeita moderada	No
8	Mina	Braco Alemão	fêmea	fértil	01-01-2004	10	30-11-2014	HVA	No	No	Suspeita moderada	No
9	Tita	Pointer Inglês	fêmea	fértil	01-03-2007	7	27-12-2014	HVA	Yes	No	Confirmado	No
10	Buddy	Basset ouand	macho	fértil	03-08-2011	3	02-12-2014	HVA	No	No	Suspeita moderada	No
11	Hachiko	Border Collie	macho	fértil	26-09-2014	0	03-01-2015	HVA	No	No	Confirmado	No
12	Patás	indeterminada	macho	fértil	01-01-2009	6	30-01-2015	HVA	No	No	Confirmado	No
13	Joaninha	indeterminada	fêmea	fértil	07-02-2012	3	07-02-2015	HVA	Yes	No	Confirmado	No
14	Diablo	Rottweiler	macho	fértil	12-12-2013	0	28-05-2014	HVR	Yes	No	Suspeita forte	Yes
15	Falcão	indeterminada	macho	fértil	01-05-2011	2	13-03-2014	HVR	Yes	No	Suspeita leve	Yes
18	Matheus	Border Collie	macho	fértil	17-04-2007	6	21-02-2014	HVR	Yes	No	Suspeita forte	Yes
20	Pepe	Weimaraner	macho	fértil	15-07-2006	7	22-04-2014	HVR	Yes	No	Suspeita leve	Yes
21	Ronnie	indeterminada	fêmea	fértil	15-01-2006	8	18-02-2014	HVR	No	No	Suspeita leve	Yes
22	Indy da Villa Mercador	Serra d'Ares	macho	fértil	15-10-2011	3	16-11-2014	FMV	Yes	No	Suspeita moderada	No
23	Guido	Teckel	macho	fértil	31-08-2008	6	16-02-2015	FMV	No	No	Suspeita moderada	No
24	Lua	indeterminada	fêmea	fértil			28-01-2015	FMV	Yes	No	Suspeita moderada	No
25	Lua	indeterminada	fêmea	fértil	24-10-2008	5	12-12-2014	FMV	No	Yes	Suspeita moderada	No
26	Lua Catarina	American Staffordshire Terrier	fêmea	ovariohisterectomia	02-10-2008	5	16-01-2014	FMV	Yes	No	Suspeita moderada	No
27	Max	Bulldog Americano	macho	fértil	01-10-2005	8	02-06-2014	FMV	Yes	No	Suspeita moderada	No
28	Baujo	Labrador	fêmea	ovariohisterectomia	21-07-2008	6	14-10-2014	HVR	Yes	No	Suspeita forte	Yes
29	Ghost	Labrador	macho	fértil	28-01-2004	11	10-02-2015	HVR	No	No	Suspeita leve	Yes
30	Lady	indeterminada	fêmea	ovariohisterectomia	19-03-2012	2	04-01-2015	HVR	Yes	No	Confirmado	Yes
31	Billy	Pastor Alemão	macho	fértil	05-12-2005	9	11-03-2015	HVA	Yes	No	Suspeita moderada	No

Quadro 16 – Página 2 da listagem de dados obtidos pelo preenchimento do formulário.

ID	Serogrupo	Titulação mais elevada	ELISA	Seroconversão	Titulação	PCR	Resultado	Histopatologia	Resultado2	Letargia	Inapetência	Anorexia	Vômito	Diarreia
1			Yes	IgG +	1/800	No		No		Yes	Yes	No	No	No
2			No			No		Yes	positivo	Yes	No	Yes	No	No
3			Yes	IgG +	1/400	No		No		No	No	Yes	Yes	No
4			Yes	IgG +	1/1600	No		No		Yes	No	No	Yes	No
5			Yes	IgG +	1/800	No		No		Yes	No	Yes	Yes	Yes
6			Yes	IgG - IgM -	negativo	Yes	positivo	No		Yes	No	Yes	No	No
7			Yes	IgG +	1/3200	No		No		Yes	Yes	Yes	Yes	No
8			Yes	IgG + IgM +		No		No		Yes	No	No	Yes	Yes
9			Yes	IgG + IgM +		Yes	positivo	No		Yes	Yes	Yes	No	No
10			Yes	IgG + IgM +		No		No		Yes	Yes	Yes	No	No
11			Yes	IgG - IgM +	1/200	Yes	positivo	No		Yes	No	Yes	Yes	No
12			No			Yes	positivo	No		Yes	No	Yes	Yes	No
13			No			Yes	positivo	No		Yes	Yes	No	Yes	No
14	Misto	1/1600	No			No		No		No	No	Yes	Yes	No
15	Australis (Australis)	1/100	No			No		No		No	No	No	Yes	No
18	Misto	1/1600	No			No		No		No	No	No	Yes	No
20	Australis (Australis)	1/400	No			No		No		Yes	No	No	Yes	No
21	Australis (Australis)	1/400	No			No		No		No	Yes	Yes	Yes	No
22			Yes	IgG + IgM +		No		No		Yes	No	No	Yes	Yes
23			Yes	IgG + IgM +		No		No		Yes	Yes	No	Yes	No
24			Yes	IgG + IgM +		No		No		Yes	No	No	No	No
25			Yes	IgG + IgM +		No		No		No	No	Yes	Yes	No
26			Yes	IgG + IgM +		No		No		No	No	Yes	Yes	Yes
27			Yes	IgG + IgM +		No		No		No	No	Yes	Yes	No
28	Australis (Braislava)	1/800	No			No		No		Yes	No	Yes	No	No
29	Pomona	1/400	No			No		No		Yes	Yes	No	Yes	No
30	Grippotyphosa	1/200	No			No		Yes	positivo	Yes	Yes	No	No	No
31			Yes	IgG + IgM +		No		No		No	Yes	Yes	Yes	Yes

Quadro 17 – Página 3 da listagem de dados obtidos pelo preenchimento do formulário.

ID	Polidipsia	Poliúria	Fraqueza	Perda de Peso	Taquipneia	Desidratação	Febre	Hipotermia	Mucosas pálidas	Mucosas icterícias	Mucosas hiperêmicas	Palpação abdominal dolorosa	Auscultação pulmonar alterada
1	No	No	Yes	No	No	Yes	Yes	No	No	Yes	No	No	No
2	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
3	Yes	No	No	No	No	Yes	No	No	No	No	No	Yes	No
4	No	Yes	No	No	No	Yes	No	No	No	No	Yes	Yes	Yes
5	No	No	Yes	No	No	No	No	No	No	Yes	No	No	No
6	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	Yes	No
7	No	No	No	No	No	Yes	No	Yes	No	No	No	No	No
8	No	No	No	No	No	Yes	No	No	No	Yes	No	No	No
9	No	No	No	No	No	No	No	Yes	No	No	No	No	No
10	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	Yes	No
11	No	No	No	No	Yes	No	No	No	No	No	No	Yes	Yes
12	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	Yes	No
13	No	No	No	No	No	No	No	No	No	Yes	No	Yes	No
14	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
15	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
18	No	No	No	No	No	No	No	Yes	Yes	No	No	No	No
20	No	No	No	No	No	Yes	No	No	No	Yes	No	No	No
21	No	No	No	Yes	No	No	No	No	No	Yes	No	No	No
22	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	Yes	No
23	Yes	Yes	No	Yes	No	Yes	No	No	No	No	No	No	No
24	No	No	No	No	No	Yes	No	No	No	No	No	No	Yes
25	No	No	No	No	No	No	No	No	No	Yes	No	Yes	No
26	No	No	No	No	No	Yes	No	No	No	No	No	No	No
27	No	No	No	No	No	No	No	No	No	Yes	No	No	Yes
28	No	No	No	Yes	No	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No
29	No	No	No	No	No	No	No	No	Yes	No	No	No	No
30	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
31	No	No	No	No	No	No	No	No	No	Yes	Yes	No	No

Quadro 18 – Página 4 da listagem de dados obtidos pelo preenchimento do formulário.

ID	Dispneia	Taquipneia	Linfadenomegália	Conjuntivite	Hipertensão	Hipotensão	Lesões dermatológicas	Anemia	Eritrocitose	Leucocitose	Neutrofilia	Linfopenia
1	No	No	No	No	No	No	No	Yes	No	Yes	Yes	No
2	No	No	No	No	No	No	No	Yes	No	Yes	Yes	No
3	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
4	No	No	No	No	No	No	No	No	No	Yes	Yes	No
5	No	No	Yes	No	No	No	No	No	No	Yes	Yes	No
6	No	No	No	Yes	No	No	Yes	No	No	No	Yes	No
7	No	No	No	No	Yes	No	No	No	No	Yes	Yes	No
8	No	No	No	No	No	No	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No
9	Yes	No	No	No	No	No	No	No	No	Yes	Yes	No
10	No	No	No	No	No	No	No	Yes	No	No	No	No
11	No	Yes	No	No	No	No	No	Yes	No	No	No	No
12	No	No	No	No	No	No	No	No	No	Yes	Yes	No
13	Yes	No	No	No	No	No	No	No	No	Missing	Missing	Missing
14	No	No	No	No	No	No	No	No	Yes	No	No	No
15	No	Yes	No	No	No	No	No	Yes	No	Yes	Yes	No
18	No	No	Yes	No	No	Yes	No	Yes	No	Yes	Yes	No
20	No	No	No	No	No	No	No	No	No	Yes	Yes	No
21	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
22	No	No	No	No	No	No	No	No	No	Yes	Yes	No
23	No	No	No	No	No	No	No	Missing	Missing	Missing	Missing	Missing
24	No	No	No	No	No	No	No	Missing	Missing	Missing	Missing	Missing
25	No	No	No	No	No	No	No	Yes	No	Yes	Yes	No
26	No	No	No	No	No	No	No	No	No	Yes	Yes	No
27	No	No	No	No	No	No	No	No	No	Yes	Yes	No
28	No	No	No	No	No	No	No	Yes	No	No	No	No
29	No	No	No	No	No	No	No	Yes	No	Yes	Yes	No
30	No	No	No	No	No	No	No	Missing	Missing	Missing	Missing	Missing
31	No	No	No	No	No	No	No	No	Yes	Yes	Yes	No

Quadro 19 – Página 5 da listagem de dados obtidos pelo preenchimento do formulário.

ID	Monocitose	Trombocitopénia	Trombocitose	Linfocitose	Taquicárdia	Petéquias	Ureia	Crea	FAS	ALT	PT	Alb	Glu
1	No	Yes	No	No	No	No	aumentado	aumentado	aumentado	aumentado	normal	não medido	não medido
2	No	Yes	No	No	No	No	aumentado	aumentado	normal	não medido	não medido	normal	normal
3	No	No	No	No	No	No	aumentado	aumentado	aumentado	aumentado	não medido	não medido	normal
4	No	Yes	Yes	Yes	No	No	aumentado	aumentado	aumentado	aumentado	não medido	não medido	aumentado
5	No	Yes	No	No	No	No	aumentado	aumentado	aumentado	aumentado	não medido	normal	não medido
6	No	No	No	No	No	No	aumentado	aumentado	aumentado	aumentado	não medido	normal	aumentado
7	No	No	No	No	Yes	No	aumentado	aumentado	normal	não medido	não medido	não medido	não medido
8	No	No	No	No	No	No	aumentado	aumentado	aumentado	aumentado	não medido	normal	não medido
9	No	No	No	No	No	No	aumentado	aumentado	aumentado	aumentado	não medido	normal	não medido
10	No	Yes	No	No	No	No	aumentado	aumentado	aumentado	normal	não medido	normal	aumentado
11	No	Yes	No	No	No	No	aumentado	aumentado	aumentado	normal	normal	normal	aumentado
12	No	Yes	No	No	No	No	aumentado	aumentado	aumentado	aumentado	não medido	normal	aumentado
13	Missing	Missing	Missing	Missing	No	No							aumentado
14	No	No	Yes	No	No	No	aumentado	aumentado	aumentado	normal	aumentado	normal	aumentado
15	Yes	No	No	No	No	No	aumentado	aumentado	normal	normal	normal	não medido	normal
18	Yes	No	No	No	No	No	aumentado	aumentado	aumentado	normal	normal	diminuído	normal
20	No	Yes	No	No	Yes	Yes	aumentado	aumentado	aumentado	aumentado	normal	não medido	aumentado
21	No	No	No	No	No	No	normal	normal	aumentado	aumentado	normal	não medido	normal
22	No	Yes	No	No	No	No	aumentado	aumentado	aumentado	normal	não medido	normal	aumentado
23	Missing	Missing	Missing	Missing	No	No	aumentado	aumentado					
24	Missing	Missing	Missing	Missing	No	No	aumentado	normal	aumentado	aumentado	não medido	não medido	aumentado
25	Yes	No	No	No	No	No	aumentado	aumentado	aumentado	aumentado	normal	normal	não medido
26	Yes	Yes	No	No	No	No	aumentado	aumentado	normal	aumentado	normal	normal	normal
27	Yes	Yes	No	No	No	No	aumentado	aumentado	não medido	aumentado	normal	normal	normal
28	Yes	No	No	No	No	No	aumentado	aumentado	não medido	aumentado	não medido	não medido	não medido
29	Yes	No	No	No	Yes	No	aumentado	aumentado	normal	normal	normal	diminuído	normal
30	Missing	Missing	Missing	Missing	No	No	aumentado	aumentado	normal	normal	normal	normal	normal
31	No	No	No	No	No	No	aumentado	aumentado	aumentado	aumentado	aumentado	normal	não medido

Quadro 20 – Página 6 da listagem de dados obtidos pelo preenchimento do formulário.

ID	Fósforo inorgânico	Tbil	Na	Cl	K	Fez urinalíse	Isostenúria	Hipostenúria	Glucosúria	Proteinúria	Púria	Hematúria	Bilirrubinúria
1	não medido	não medido	não medido	não medido	não medido	No	No	No	No	No	No	No	No
2	não medido	não medido	não medido	não medido	não medido	No	No	No	No	No	No	No	No
3	não medido	não medido	diminuído	normal	aumentado	No	No	No	No	No	No	No	No
4	não medido	não medido	diminuído	diminuído	diminuído	No	No	No	No	No	No	No	No
5	não medido	não medido	não medido	não medido	não medido	No	No	No	No	No	No	No	No
6	não medido	não medido	normal	diminuído	normal	No	No	No	No	No	No	No	No
7	não medido	não medido	diminuído	diminuído	normal	No	No	No	No	No	No	No	No
8	não medido	não medido	diminuído	diminuído	aumentado	No	No	No	No	No	No	No	No
9	não medido	não medido	normal	normal	normal	No	No	No	No	No	No	No	No
10	não medido	não medido	diminuído	normal	aumentado	Yes	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes	No
11	não medido	não medido	diminuído	diminuído	normal	No	No	No	No	No	No	No	No
12	aumentado	aumentado	diminuído	diminuído	diminuído	Yes	No	No	Yes	Yes	No	No	No
13		aumentado	normal	diminuído	diminuído	No	No	No	No	No	No	No	No
14	aumentado	não medido	diminuído	normal	diminuído	No	No	No	No	No	No	No	No
15	não medido	não medido	não medido	não medido	não medido	No	No	No	No	No	No	No	No
18	aumentado	não medido	diminuído	não medido	normal	Yes	No	No	Yes	Yes	No	No	No
20	não medido	não medido	não medido	não medido	não medido	No	No	No	No	No	No	No	No
21	não medido	aumentado	não medido	não medido	não medido	No	No	No	No	No	No	No	No
22	não medido	normal	não medido	não medido	normal	Yes	No	No	Yes	Yes	No	Yes	No
23						Yes	No	No	Yes	Yes	No	Yes	No
24	normal	não medido	diminuído	diminuído	diminuído	No	No	No	No	No	No	No	No
25	não medido	não medido	diminuído	diminuído	diminuído	No	No	No	No	No	No	No	No
26	não medido	não medido	não medido	não medido	não medido	No	No	No	No	No	No	No	No
27	não medido	aumentado	normal	diminuído	normal	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	Yes	No
28	aumentado	aumentado	não medido	não medido	não medido	No	No	No	No	No	No	No	No
29	normal	não medido	diminuído	diminuído	normal	No	No	No	No	No	No	No	No
30	não medido	não medido	não medido	não medido	não medido	No	No	No	No	No	No	No	No
31	não medido	não medido	não medido	não medido	não medido	No	No	No	No	No	No	No	No

Quadro 21 – Página 7 da listagem de dados obtidos pelo preenchimento do formulário.

ID	Cilindrúria	Cetonúria	Cristalúria	RactioUPC	Fez urocultura	Resultado3	Fez ecografia	Eco renal normal	Renomegália	Córtex hiperecogénico	Perda de diferenciação CM	Rim Medulary Sign
1	No	No	No	não medido	No		No	Missing	No	No	No	No
2	No	No	No	não medido	No		No	Missing	No	No	No	No
3	No	No	No	não medido	No		No	Missing	No	No	No	No
4	No	No	No	não medido	No		Yes	No	No	No	No	Yes
5	No	No	No	não medido	No		Yes	No	Yes	No	No	Yes
6	No	No	No	não medido	No		Yes	No	No	Yes	No	No
7	No	No	No	não medido	No		Yes	No	Yes	No	No	No
8	No	No	No	não medido	No		No	Missing	No	No	No	No
9	No	No	No	não medido	No		Yes	Yes	No	No	No	No
10	No	No	No	não medido	No		Yes	Yes	No	No	No	No
11	No	No	No	não medido	No		Yes	No	Yes	Yes	No	Yes
12	No	No	No	normal	No		Yes	No	No	Yes	No	No
13	No	No	No	não medido	No		Yes	No	No	No	No	No
14	No	No	No	não medido	No		Yes	No	Yes	Yes	No	No
15	No	No	No	não medido	No		Yes	No	Yes	Yes	No	Yes
18	Yes	No	No	não medido	Yes	negativo	Yes	No	Yes	No	Yes	No
20	No	No	No	não medido	No		Yes	No	No	No	No	Yes
21	No	No	No	não medido	Yes	negativo	Yes	Yes	No	No	No	No
22	No	No	No	não medido	No		Yes	No	No	No	No	No
23	No	No	No	aumentado	No		Yes	No	No	No	No	No
24	No	No	No	não medido	No		No	Missing	No	No	No	No
25	No	No	No	não medido	No		Yes	Missing	Yes	No	No	No
26	No	No	No	não medido	No		Yes	No	No	Yes	No	No
27	No	No	No	não medido	No		No	Missing	No	No	No	No
28	No	No	No	não medido	No		No	Missing	No	No	No	No
29	No	No	No	não medido	No		Yes	No	No	No	No	No
30	No	No	No	não medido	No		Yes	No	No	No	Yes	No
31	No	No	No	não medido	No		Yes	No	Yes	No	No	No

Quadro 22 – Página 8 da listagem de dados obtidos pelo preenchimento do formulário.

ID	Hiperrecogenicidade difusa	Plelectasia	Calcificação medular	Fluido retroperitoneal	Fluido subcapsular	Outro	Eco hepática normal	Hepatomegália	Hiperrecogenicidade	Hipoecogenicidade	Outrol
1	No	No	No	No	No	No	Missing	No	No	No	No
2	No	No	No	No	No	No	Missing	No	No	No	No
3	No	No	No	No	No	No	Missing	No	No	No	No
4	Yes	Yes	No	No	No	No	Yes	No	No	No	No
5	No	No	No	No	No	No	No	No	No	Yes	No
6	No	No	No	Yes	No	No	No	No	No	No	Yes
7	No	No	No	No	Yes	No	Yes	No	No	No	No
8	No	No	No	No	No	No	Missing	No	No	No	No
9	No	No	No	No	No	No	No	Yes	No	Yes	Yes
10	No	No	No	No	No	No	No	Yes	No	No	No
11	No	No	No	No	No	No	Yes	No	No	No	No
12	No	No	No	No	Yes	No	No	Yes	No	No	No
13	No	No	No	Yes	No	No	No	No	No	No	Yes
14	No	No	No	No	No	No	No	Yes	No	No	No
15	No	No	No	No	No	No	Yes	No	No	No	No
18	No	No	No	No	No	No	No	Yes	No	No	No
20	No	No	No	Yes	No	No	No	Yes	No	No	No
21	No	No	No	No	No	No	No	Yes	No	No	Yes
22	Yes	No	Yes	No	No	No	No	No	No	Yes	No
23	Yes	No	No	No	No	No	Yes	No	No	No	No
24	No	No	No	No	No	No	Missing	No	No	No	No
25	No	No	No	No	No	No	No	Yes	No	Yes	No
26	No	No	No	No	No	No	No	Yes	No	Yes	No
27	No	No	No	No	No	No	Missing	No	No	No	No
28	No	No	No	No	No	No	Missing	No	No	No	No
29	Yes	No	No	No	No	No	No	Yes	No	No	No
30	No	No	No	No	No	No	Yes	No	No	No	No
31	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	Yes

Quadro 23 – Página 9 da listagem de dados obtidos pelo preenchimento do formulário.

ID	Restante eco normal	Esplenomegalia	Linfadenomegalia	Outro2	Fez radiografia torácica	Sinais compatíveis com hemorragia pulmonar	Ampicilina	Enrofloxacina	Doxiciclina	Metronidazol
1	Missing	No	No	No	No	Missing	Yes	Yes	No	No
2	Missing	No	No	No	Yes	Yes	No	No	Yes	Yes
3	Missing	No	No	No	Yes	Yes	No	No	Yes	No
4	Yes	No	No	No	Yes	Yes	No	Yes	No	No
5	No	No	Yes	No	No	Missing	Yes	Yes	No	No
6	Yes	No	No	No	Yes	Yes	Yes	No	No	No
7	Yes	No	No	No	Yes	Yes	No	No	No	No
8	Missing	No	No	No	No	Missing	Yes	No	No	No
9	Missing	No	No	No	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No
10	No	Yes	Yes	No	No	Missing	No	No	Yes	No
11	Yes	No	No	No	Yes	Yes	No	No	Yes	No
12	Yes	No	No	No	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes
13	No	No	No	Yes	No	Missing	No	No	No	No
14	No	Yes	Yes	No	No	Missing	Yes	No	Yes	No
15	No	Yes	Yes	No	No	Missing	Yes	No	No	No
18	No	Yes	No	Yes	No	Missing	Yes	No	No	No
20	Yes	No	No	No	Yes	Yes	Yes	No	No	Yes
21	Yes	No	No	No	No	Missing	No	No	Yes	No
22	No	Yes	No	No	No	Missing	Yes	No	Yes	No
23	Yes	No	No	No	No	Missing	Yes	No	Yes	No
24	Missing	No	No	No	No	Missing	Yes	No	Yes	No
25	No	No	Yes	No	No	Missing	Yes	Yes	Yes	No
26	Yes	No	No	No	No	Missing	Yes	Yes	Yes	Yes
27	Missing	No	No	No	No	Missing	Yes	No	No	No
28	Missing	No	No	No	No	Missing	Yes	No	Yes	No
29	No	Yes	No	No	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No
30	No	Yes	No	No	No	Missing	No	No	No	No
31	Yes	No	No	No	Yes	Yes	Yes	No	No	Yes

Quadro 24 – Página 10 da listagem de dados obtidos pelo preenchimento do formulário.

ID	Amoxicilina.AcClav	Corticoterapia	Terapia de substituição renal	Duração da hospitalização (dias)	Quadro pulmonar durante hospitalização	Alta	Baixa	Eutanásia	Causa de morte
1	No	Yes	No	0	Yes	No	Yes	No	Hemorragia pulmonar
2	No	Yes	No	1	Yes	No	No	Yes	Hemorragia pulmonar
3	No	No	No	2	Yes	No	No	Yes	Hemorragia pulmonar
4	Yes	No	No	6	Yes	No	Yes	No	Hemorragia pulmonar
5	Yes	No	No	2	No	No	No	Yes	Contenção de custos
6	No	No	No	1	Yes	No	Yes	No	Hemorragia pulmonar
7	Yes	No	No	1	Yes	No	No	Yes	Hemorragia pulmonar
8	No	No	No	0	Yes	No	Yes	No	Hemorragia pulmonar
9	Yes	No	No	8	Yes	Yes	No	No	
10	No	No	No	6	No	Yes	No	No	
11	No	No	No	5	Yes	Yes	No	No	
12	Yes	No	Yes	10	Yes	Yes	No	No	
13	No	No	No	0	Yes	No	No	Yes	Hemorragia pulmonar
14	No	No	Yes	7	No	Yes	No	No	
15	No	No	No	3	Yes	No	No	Yes	Contenção de custos
18	No	No	No	4	No	Yes	No	No	
20	No	No	Yes	4	Yes	No	Yes	No	Hemorragia pulmonar
21	No	No	No	5	No	Yes	No	No	
22	No	No	No	8	No	Yes	No	No	
23	Yes	No	No	19	No	No	No	Yes	Outra
24	Yes	No	No	5	No	Yes	No	No	
25	No	No	No	8	No	Yes	No	No	
26	No	No	No	10	No	Yes	No	No	
27	No	No	No	3	Yes	No	Yes	No	Hemorragia pulmonar
28	No	Yes	No	4	No	Yes	No	No	
29	No	No	Yes	4	Yes	No	Yes	No	Hemorragia pulmonar
30	No	No	No	1	Yes	No	Yes	No	Hemorragia pulmonar
31	No	No	No	2	Yes	No	Yes	No	Hemorragia pulmonar

Anexo III – Resultados da tabulação cruzada (valores de p)

Quadro 25 – Resultados da tabulação cruzada entre o sexo do e a alta e entre os casos de referência e a alta (valor de p).

	Valor de p
Sexo	0,390
Referência	0,352

Quadro 26 – Resultados da tabulação cruzada entre os sinais de anamnese e exame clínico e a alta (valor de p).

Sinais de anamnese	Valor de p
Inapetência	0,172
Taquipneia	0,214
Perda de peso	0,228
Poliúria	0,159
Polidipsia	0,159
Vômito	0,328
Anorexia	0,060
Fraqueza muscular	0,159
Diarreia	0,455
Letargia	0,194
Sinais de exame clínico	Valor de p
Petéquias	0,286
Mucosas hiperêmicas	0,159
Lesões dermatológicas	0,159
Taquicárdia	0,085
Mucosas ictéricas	0,079
Conjuntivite	0,286
Hipotensão	0,214
Mucosas Pálidas	0,429
Taquipneia	0,429
Hipertensão	0,286
Hipotermia	0,228
Dispneia	0,429
Linfadenomegália periférica	0,429
Febre	0,429
Ausculatação pulmonar alterada	0,389
Palpação abdominal dolorosa	0,194
Desidratação	0,172

Quadro 27 – Resultados da tabulação cruzada entre os sinais de hemograma e a alta (valor de p).

Hemograma	Valor de p
Linfocitose	0,542
Trombocitose	0,717
Neutrofilia	0,048
Trombocitopénia	0,523
Leucocitose	0,122
Monocitose	0,395
Eritrocitose	0,697
Anemia	0,466

Quadro 28 – Resultados da tabulação cruzada entre os sinais de hemograma e a presença de quadro pulmonar durante a hospitalização (valor de p).

Hemograma	Valor de p
Linfocitose	0,625
Trombocitose	0,619
Neutrofilia	0,113
Trombocitopénia	0,582
Leucocitose	0,208
Monocitose	0,208
Eritrocitose	0,600
Anemia	0,530

Quadro 29 - Resultados da tabulação cruzada entre os sinais de bioquímicos e a alta (valor de p).

Bioquímica	Valor de p
Ureia aumentada	0,444
Creatinina aumentada	0,188
FAS aumentada	0,118
ALT aumentada	0,278
Hiperproteinémia	0,731
Hipoalbuminémia	0,735
Hiperglicémia	0,242
Hiperfosfatémia	0,333
Hiperbilirrubinémia	0,666
Ionograma	Valor de p
Hiponatrémia	0,284
Hipoclorémia	0,231
Hipocalémia	0,471
Hipercalémia	0,576

Quadro 30 - Resultados da tabulação cruzada entre os sinais de urianálise e a alta (valor de p).

Urianálise	Valor de p
Isostenúria	0,333
Glicosúria	0,194
Hematúria	0,400
Piúria	0,666
Cilindrúria	0,666
Rácio UPC	0,500

Quadro 31 - Resultados da tabulação cruzada entre os sinais ecográficos e a alta (valor de p).

Ecografia	Valor de p
Alterações na eco renal	0,074
Alterações na eco hepática	0,094
Alterações na restante eco	0,500

Quadro 32 - Resultados da tabulação cruzada entre terapêutica e a alta e entre a evolução clínica e a alta (valor de p).

Terapêutica	Valor de p
Ampicilina	0,570
Doxiciclina	0,00017
Amoxi. Clav.	0,666
Enrofloxacina	0,521
Metronidazol	0,643
Corticoterapia	0,610
Terapia de substituição renal	0,583
Evolução	Valor de p
Quadro pulmonar durante hospitalização	0,0013

Quadro 33 - Resultados da tabulação cruzada entre a média da idade e a alta e entre a média dos dias de hospitalização e a alta (valor de p).

Médias	Valor de p
Média da idade	0,051
Média dos dias de hospitalização	0,0004