

UNIVERSIDADE SANTO AMARO (UNISA)

Mestrado em Saúde Única

MARCIO MUNIZ BARRETO SILVA

**Avaliação Diagnóstica da Leptospirose Aguda em Felinos
Domésticos: Uso Combinado de Técnicas Sorológicas, Moleculares
e Isolamento**

São Paulo

2025

MARCIO MUNIZ BARRETO SILVA

**Avaliação Diagnóstica da Leptospirose Aguda em Felinos
Domésticos: Uso Combinado de Técnicas Sorológicas, Moleculares
e Isolamento**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação *Stricto
Sensu* em Saúde Única da Universidade
Santo Amaro – UNISA, como requisito
parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador:

Prof. Dr. Bruno Alonso Miotto

São Paulo

2025

S581a	<p>Silva, Marcio Muniz Barreto Avaliação diagnóstica da leptospirose aguda em felinos domésticos: uso combinado de técnicas sorológicas, moleculares e isolamento / Marcio Muniz Barreto Silva. – São Paulo, 2025.</p> <p>43 p. : il., color. Orientador: Prof. Dr. Bruno Alonso Miotto.</p> <p>Dissertação. (Mestrado em Saúde Única) - Universidade Santo Amaro, 2025. Bibliografia incluída.</p> <p>1. Azotemia. 2. Febre. 3. Leptospiras. I. Miotto, Bruno Alonso. II. Universidade Santo Amaro. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDD 616.6</p>
-------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Dedico este trabalho, a Energia Sublime que rege o universo, a toda expressão de vida e aos meus pais pelas referências e incentivo na busca pelo conhecimento.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos os professores do Programa de Mestrado em Saúde Única, em especial a Professora Dra. Adriana Cortez e ao Professor Dr. Bruno Alonso Miotto por toda ajuda e incentivo, a professora Stephanie Bergman Esteves, a Universidade Santo Amaro pela oportunidade de realizar este sonho, a CAPES pela bolsa de estudos proporcionada, a Universidade de São Paulo (USP), pela parceria, ao HOVET-UNISA e toda equipe de médicos veterinários, a minha amada esposa e companheira de sempre Fabiana Andrea Messias Silva por estar ao meu lado nos momentos de maior dificuldade, a Dona Maria por toda ajuda e por permitir encontrar a motivação há tempos perdida, as graduandas, de Medicina Veterinária, Gabriele Yumi e Mariana pela imensa contribuição para a realização desta pesquisa, e para finalizar, agradeço aos tutores e animais que tornaram essa pesquisa factível.

A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

A leptospirose é uma zoonose bacteriana que acomete uma ampla diversidade de mamíferos. Apesar do número cada vez maior de estudos em populações felinas e do crescente reconhecimento da importância dos gatos na epidemiologia da leptospirose, pouco se sabe sobre a forma aguda da doença nessa espécie, que é considerada rara. Nesse contexto, a carência de informações sobre o quadro clínico tipicamente apresentado por gatos pode mascarar o reconhecimento da doença e, conseqüentemente, dificultar estimativas de incidência da doença nessa espécie. Deste modo, considerando os fatos citados acima, este estudo teve como objetivo identificar gatos com leptospirose aguda atendidos no HOVET UNISA-São Paulo, Brasil, por meio da realização de testes moleculares (PCR), sorológicos (MAT) e microbiológicos (cultura) em amostras de sangue, soro e urina de gatos. A partir da identificação de casos positivos, foi realizada análise descritiva das alterações clínico-laboratoriais dos animais. Assim sendo, amostras de sangue foram coletadas entre abril de 2023 a novembro de 2024, de 76 gatos com quadros de azotemia (ureia e creatinina acima de 60mg/dL e 1,6g/dL, respectivamente) e/ou icterícia e/ou febre, na tentativa de estabelecer o diagnóstico definitivo de leptospirose. Gatos que apresentaram azotemia decorrente de quadro obstrutivo foram excluídos do estudo. As amostras foram destinadas à amplificação do gene 16S por meio da PCR. Amostras positivas foram submetidas a ensaio quantitativo em tempo real do gene *lipL32* para confirmação dos resultados. Dos animais incluídos no estudo, foi possível amplificar DNA de leptospiros de 3,9 % (3/76), dos quais somente dois (Animal 1 e Animal 2) apresentaram amplificação de material genético no ensaio de qPCR. O Animal 1 tinha como queixa principal tosse e apetite seletivo. Após realização de exame físico e exames de imagem, foi constatado quadro de broncopneumonia. Já o Animal 2 apresentava como queixa principal quadro de disúria, polaquiúria e êmese. Na ultrassonografia apresentou espessamento de paredes de duodeno, jejuno e íleo, podendo estar associado a processo inflamatório com diferencial para infiltrado neoplásico. Os rins apresentavam perda moderada da definição corticomedular, cortical espessa e com ecogenicidade elevada em ambos os rins. Apesar de ambos os animais apresentarem discreta azotemia, nenhum deles manifestou febre ou icterícia, e nos

dois casos, o quadro de leptospirose aguda não foi considerado como suspeita inicial. Os resultados demonstraram que a leptospirose aguda em gatos pode não causar sintomatologia tipicamente associada à infecção aguda como ocorre em outras espécies, notavelmente o cão. A falta de reconhecimento da doença em gatos pode levar à falsa percepção de que a leptospirose felina tem ocorrência esporádica ou de menor importância na clínica médica.

Palavras-chave: Azotemia; Febre; Felinos; *Leptospira* spp.; Leptospiras.

ABSTRACT

Leptospirosis is a bacterial zoonosis that affects a wide range of mammals. Despite the increasing number of studies in feline populations and the growing recognition of the importance of cats in the epidemiology of leptospirosis, little is known about the acute form of disease in this species, which is considered rare. In the meantime, the lack of information on the clinical presentation typically presented by cats can mask the recognition of the disease and, consequently, make it difficult to estimate the incidence of the disease in this species. Thus, considering the facts mentioned above, this study aimed to identify cats with acute leptospirosis treated at HOVET UNISA-São Paulo, Brazil, by performing molecular (PCR), serological (MAT) and microbiological (culture) tests on blood, serum and urine samples from cats. Based on the identification of positive cases, a descriptive analysis of the clinical and laboratory alterations of the animals was performed. Therefore, blood samples were collected between April 2023 and November 2024 from 76 cats with azotemia (urea and creatinine above 60 mg/dL and 1.6 g/dL, respectively) and/or jaundice and/or fever, in an attempt to establish a definitive diagnosis of leptospirosis. Cats that presented azotemia due to obstructive conditions were excluded from the study. The samples were intended for amplification of the 16S gene by PCR. Positive samples were subjected to a real-time quantitative assay of the *lipL32* gene to confirm the results. Of the animals included in the study, it was possible to amplify leptospiral DNA from 3.9% (3/76), of which only two (Animal 1 and Animal 2) showed amplification of genetic material in the qPCR assay. Animal 1 had coughing and selective appetite as its main complaint. After physical examination and imaging tests, bronchopneumonia was diagnosed. Animal 2 presented dysuria, pollakiuria and emesis as its main complaints. Ultrasonography showed thickening of the duodenal, jejunal and ileal walls, which may be associated with an inflammatory process with differential diagnosis of neoplastic infiltrate. The kidneys showed moderate loss of corticomedullary definition, thick cortical bone and high echogenicity in both kidneys. Although both animals presented mild azotemia, neither of them showed fever or jaundice, and in both cases, acute leptospirosis was not considered an initial suspicion. The results demonstrated that acute leptospirosis in cats may not

cause symptoms typically associated with acute infection as occurs in other species, notably dogs. Failure to recognize the disease in cats may lead to the false perception that feline leptospirosis occurs sporadically or is of minor importance in clinical medicine.

Keywords: Azotemia; Fever; Felines; *Leptospira spp.*; Leptospire.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3. MATERIAL E MÉTODO	17
3.1 Desenho experimental e critérios de inclusão	17
3.2 Coleta e acondicionamento de amostras	17
3.3 Critérios diagnósticos	18
3.4 Teste de soroglutinação microscópica (MAT)	19
3.5 Extração de DNA E Reação da polimerase em cadeia PCR	19
3.6 Cultura de leptospiras	20
3.7 Análises estatísticas	20
4. RESULTADO	21
4.1 Alterações clínico-laboratoriais dos animais com infecção confirmada 23	
4.1.1 Caso 1	23
4.1.2 Caso 2	26
5. DISCUSSÃO	30
CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS	35

1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose bacteriana negligenciada que acomete uma ampla diversidade de mamíferos, incluindo humanos, podendo causar doença com manifestações clínicas agudas e fatais (SCHULLER *et al.*, 2015). Estima-se que anualmente ocorram mais de um milhão de casos de leptospirose humana em escala global, levando a quase 60.000 mortes por ano (COSTA *et al.*, 2015). No Brasil, somente entre 2010 e 2020, foram confirmados 39.707 casos da enfermidade (DATASUS, 2022), embora estime-se que a taxa de subnotificação seja elevada, fazendo com que a incidência real da doença seja muito superior à apontada pelos registros oficiais.

Dentro do gênero *Leptospira* já foram descritos mais de 300 sorovares, que são agrupados entre si em sorogrupos antigenicamente relacionados (CERQUEIRA & PICARDEAU, 2009; GREENE *et al.*, 2015). Alguns sorovares tendem a ter um hospedeiro de manutenção específico, que frequentemente corresponde a uma espécie de mamífero que alberga a bactéria nos rins de forma assintomática, com subsequente eliminação do patógeno na urina por longos períodos (ARBER, 1977; BHARTI *et al.*, 2003; LEHMANN *et al.*, 2014). É, portanto, uma doença cuja transmissão é mediada por diversas espécies animais, que quando infectadas promovem intensa contaminação ambiental, fazendo com que a transmissão do patógeno seja comum em locais com altos índices pluviométricos e estruturas precárias de saneamento básico (LEVETT, 2001).

Embora os roedores sejam considerados a principal fonte de infecção para humanos (HAAKE & LEVETT, 2015a; NAING *et al.*, 2019), diversas espécies de mamíferos podem atuar como hospedeiros reservatórios, incluindo animais domésticos como os cães, bovinos, ovinos, caprinos e equinos (GUERNIER *et al.*, 2016). Em animais, a transmissão direta decorre do contato com urina contaminada, mediada frequentemente pelo predatismo de animais infectados e pelo contato com material biológico contaminado (SYKES *et al.*, 2010). A transmissão indireta, que é mais comum, ocorre quando indivíduos susceptíveis se infectam por leptospirosas patogênicas mantidas no ambiente (SYKES *et al.*, 2010).

Após penetrar no organismo animal pela via cutânea e atingir a circulação sanguínea, as leptospirosas se multiplicam rapidamente na corrente sanguínea do hospedeiro acometido, atingindo tecidos e órgãos como rins, fígado, baço, sistema

nervoso central, olhos e trato genital (ADLER & DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; HAAKE & LEVETT, 2015b). Na maior parte dos casos a infecção é debelada pelo sistema imune do hospedeiro, embora seja comum mesmo nesses casos a colonização renal e estabelecimento do estado portador.

Em alguns casos, no entanto, os animais não conseguem debelar a infecção durante a fase de leptospiremia e podem apresentar uma ampla gama de sintomas, que levam frequentemente à morte por complicações sistêmicas (HAAKE & LEVETT, 2015b). Ou seja, além da forma assintomática, o patógeno pode promover também quadro agudo com manifestação clínica da infecção, principalmente em hospedeiros acidentais, que não estão adaptados a manter o sorovar infectante em seus tecidos renais. Em cães, por exemplo, os sinais clínicos mais comuns são decorrentes dos quadros de insuficiência renal e hepática, podendo ocorrer também quadros de uveíte, hemorragia pulmonar, febre, abortamento, anorexia, mialgia, choque hipovolêmico, edema periférico, vômitos, diarreia, sangramento e dor abdominal ou lombar (SCHULLER *et al.*, 2015). As alterações laboratoriais mais comumente encontradas nos casos de leptospirose aguda, na maioria das espécies, são: leucocitose com desvio à esquerda, trombocitopenia, altos níveis de ureia sanguínea e creatinina sérica (VAN DE MAELE *et al.*, 2008), elevação da atividade de enzimas hepáticas, altos níveis séricos de bilirrubina total, hipoalbuminemia, isostenúria, hematúria e glicosúria (SYKES *et al.*, 2010).

Gatos, assim como outros animais domésticos e silvestres, são susceptíveis à infecção por leptospirosas (AZÓCAR-AEDO & MONTI, 2015; RICARDO *et al.*, 2023), e devido a sua proximidade e íntima relação com os seres humanos, podem levar à contaminação do ambiente familiar e conseqüente transmissão zoonótica. Mediante ao amplo espectro e inespecificidade de sinais clínicos e achados laboratoriais sugestivos de infecção aguda, o diagnóstico definitivo se baseia nos resultados de testes confirmatórios específicos para a identificação direta ou indireta do patógeno (CERQUEIRA & PICARDEAU, 2009; REAGAN & SYKES, 2019; SYKES *et al.*, 2022a), como a microscopia de campo escuro, a reação em cadeia da polimerase (PCR), o cultivo bacteriano e a titulação de anticorpos séricos.

O teste de soroprecipitação microscópica (MAT), que avalia a presença de anticorpos anti-leptospirosas no soro sanguíneo, tem sido amplamente empregado para o sorodiagnóstico da infecção aguda em humanos e animais (PINTO *et al.*, 2017). No entanto, a impossibilidade de identificar definitivamente o sorovar

infectante e diferenciar títulos vacinais de títulos de exposição têm restringido seu uso no diagnóstico da infecção (CHIRATHAWORN *et al.*, 2014). Ademais, a avaliação de uma única amostra pode falhar na detecção de anticorpos durante a fase inicial da doença, sendo frequentemente necessária a titulação de amostras obtidas durante a fase convalescente para revelar a soroconversão, o que muitas vezes não é possível devido à alta taxa de letalidade da doença.

A técnica de PCR tem sido utilizada com sucesso para confirmar a infecção por leptospiros nos estágios iniciais da doença em cães e outras espécies (FINK *et al.*, 2015; HARKIN *et al.*, 2003; MIOTTO *et al.*, 2018a; MIOTTO *et al.*, 2018b). A PCR, apesar de ser a técnica recomendada para identificar a infecção ainda na fase de leptospiremia, não apresenta resultados satisfatórios na fase convalescente da doença, haja vista, a ausência de leptospiros na corrente sanguínea do hospedeiro nesta fase (MIOTTO, *et al.*, 2018a), apresentando também limitações quando utilizada como única estratégia diagnóstica. Como o momento exato da infecção na apresentação clínica é tipicamente desconhecido, e como todos os testes de identificação direta e indireta apresentam limitações quanto à sensibilidade e especificidade diagnóstica, a depender da fase da infecção, o uso de múltiplos testes simultâneos associado ao diagnóstico clínico/laboratorial pode aumentar significativamente as chances do diagnóstico definitivo da doença e de sucesso terapêutico (FRAUNE *et al.*, 2013).

Mesmo diante do benefício da associação de diferentes técnicas, somente o isolamento de leptospiros e a subsequente caracterização dos isolados é capaz de identificar o sorogrupo ou sorovar da estirpe infectante (SCHULLER *et al.*, 2015). Infelizmente, o isolamento de leptospiros é desafiador devido ao difícil crescimento do patógeno e à frequente contaminação dos meios de cultura (SCHULLER *et al.*, 2015). Ademais, o isolamento de leptospiros em cães com leptospirose aguda também é restrito pela instituição precoce da terapia antimicrobiana, que geralmente é implementada logo após a suspeita clínica da doença (FRAUNE *et al.*, 2013).

Em gatos a infecção por leptospiros patogênicas tem sido reportada de forma crescente na literatura científica (AZÓCAR-AEDO *et al.* 2014; RICARDO *et al.*, 2023). Diversos estudos têm demonstrado evidências sorológicas de exposição de gatos a leptospiros, com soroprevalência média de 11,7%, (RICARDO *et al.*, 2023) variando de 4,8% a 48% (ALASHRAF *et al.*, 2019; MYLONAKIS *et al.*, 2005; PAIM *et al.*, 2024; SPRIßLER *et al.*, 2019; WEIS & HARTMANN, 2017;). De maneira similar,

a eliminação urinária assintomática tem sido reportada em diversas localidades (RICARDO *et al.*, 2023), e a leptospirose tem sido identificada em cerca de 13% dos felinos ao redor do mundo (RICARDO *et al.*, 2023), variando de 0,8% na Tailândia (SPRIßLER *et al.*, 2019), 1,7% na Espanha (MURILLO *et al.*, 2020), 2,7% no Brasil (PAIM *et al.*, 2024), 3,3% no Canadá e Alemanha (RODRIGUEZ *et al.*, 2014b; WEIS *et al.*, 2017), 4,9% na Malásia (ALASHRAF *et al.*, 2020), até 67,8% em Taiwan (CHAN *et al.*, 2014).

A análise molecular de fragmentos de DNA eliminados na urina de gatos têm demonstrado que essa espécie é capaz de albergar as espécies *L. interrogans* e *L. borgpetersenii* (DORSCH *et al.*, 2020; MURILLO *et al.*, 2020). A identificação dessas espécies, entretanto, não permite afirmar quais sorovares persistem nos túbulos renais de felinos, uma vez que a análise molecular de DNA, é incapaz de predizer o sorovar infectante.

Apesar do número cada vez maior de estudos em populações felinas e do crescente reconhecimento da importância dos gatos na epidemiologia da leptospirose, pouco se sabe sobre a forma aguda da doença nessa espécie, que é considerada rara por diversos autores (HARTMANN *et al.*, 2013; Murillo *et al.*, 2020.). Até o momento poucos relatos foram publicados na literatura internacional (BEAUDU-LANGE, 2014), dificultando a identificação de quais alterações podem de fato apontar para a suspeita da infecção aguda. A carência de informações sobre o quadro clínico tipicamente apresentado por gatos pode, dessa forma, mascarar o reconhecimento da doença e, conseqüentemente, dificultar as estimativas de incidência da infecção aguda nessa espécie, podendo levar a falsa percepção de que a leptospirose felina tem ocorrência esporádica e de menor importância para a clínica médica.

Dessa forma, é fundamental que estudos se dediquem a identificar animais em fase aguda e leptospirêmica da infecção, adotando para tal critérios de inclusão:

(1) Quando a titulação MAT \geq 800 para uma única amostra de soro foi registrada; (2) a soroconversão de títulos de 4 vezes encontrados entre amostras de soro pareadas por MAT foi registrada; e (3) a detecção direta de *Leptospira* spp. (detecção molecular, isolamento) de amostras de sangue ou quaisquer tecidos diferentes do rim foi descrita. Além da contribuição do ponto de vista diagnóstico e epidemiológico, a identificação de gatos com infecção aguda pode auxiliar na

determinação de quais características fisiológicas, em escala molecular, podem estar associadas à suposta resistência de felinos ao patógeno, abrindo novas e inovadoras possibilidades terapêuticas e profiláticas aplicadas às demais espécies suscetíveis à infecção, incluindo seres humanos.

Até o momento, poucos estudos se dedicaram à identificação da infecção aguda em populações de gatos. Rodrigues *et al.* investigaram a infecção por leptospiros em gatos com doença renal, no entanto a detecção direta do patógeno foi realizada pela PCR somente nas amostras de urina, o que não revela necessariamente infecção aguda nos animais avaliados (RODRIGUEZ *et al.*, 2014a). Já Shopshire *et al.* avaliaram a presença de anticorpos em gatos azotêmicos, no entanto não conduziu a identificação direta do patógeno nos animais avaliados. Em ambos os estudos, nota-se, somente animais azotêmicos foram selecionados para investigação da infecção de leptospiros (SHOPSHIRE *et al.*, 2016). O uso exclusivo desse critério de inclusão pode ser inapropriado, pois parte da premissa que gatos infectados apresentam necessariamente essa alteração.

Entretanto, em estudo recente, Kalasi *et al.*, pesquisaram DNA leptospírico em amostras de soro sanguíneo bem como também em urina de gatos comunitários, encontrando positividade de 4,4% e 2,7%, respectivamente, contribuindo de forma importante com a hipótese de que os felinos domésticos possuem um papel relevante na disseminação de leptospiros patogênicos (KALASI *et al.*, 2024).

O presente estudo visou identificar gatos com leptospirose aguda atendidos no serviço de atendimento de pequenos animais do Hospital Veterinário da Universidade Santo Amaro (HOVET UNISA), utilizando para tal o diagnóstico clínico/laboratorial da doença e a realização de testes moleculares (PCR), sorológicos (MAT) e microbiológicos (cultura) em pacientes que apresentaram quadros de azotemia e/ou icterícia e/ou febre. Pretendeu também, a partir da identificação de casos, produzir análise descritiva das alterações clínico-laboratoriais identificadas nesses animais, lançando luz sobre uma possível definição do quadro clínico decorrente da infecção aguda em felinos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Identificar a infecção aguda por *Leptospiras* patogênicas em gatos com quadros de azotemia e/ou icterícia e/ou febre atendidos no HOVET UNISA.

2.2 Objetivos específicos

- Detectar anticorpos contra *Leptospira* spp. utilizando a técnica de soroaglutinação microscópica em soro sanguíneo de felinos domésticos;
- Identificar o provável sorogrupo infectante pelas titulações obtidas na MAT;
- Realizar o diagnóstico molecular, através da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), de amostras de sangue total;
- Proceder à tentativa de isolamento e subsequente caracterização das leptospiras obtidas a partir de amostras de urina de pacientes positivos à MAT e PCR, acompanhados prospectivamente;
- Elaborar análise descritiva dos achados clínico-laboratoriais de animais com infecção aguda.

3. MATERIAL E MÉTODO

A realização do presente estudo contou com autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UNISA) emitida em parecer sob número 23.1/2023.

3.1 Desenho experimental e critérios de inclusão

Amostras de sangue total, soro e, quando possível, urina foram coletadas de gatos com quadros de azotemia e/ou icterícia e/ou febre atendidos no HOVET UNISA, no período de abril de 2023 a novembro de 2024. Por se tratar de um estudo observacional, tendo em vista somente análise descritiva dos dados, não foi necessário cálculo amostral.

Foram considerados azotêmicos gatos que apresentaram níveis elevados de ureia e creatinina sérica de origem desconhecida (acima de 60mg/dL e 1,6g/dL, respectivamente) associados ou não a manifestações clínicas sugestivas de leptospirose (distúrbios hemorrágicos, febre, vômitos, icterícia, prostração, hiporexia/anorexia). Foram incluídos no estudo também felinos que apresentaram icterícia e/ou quadro de febre de origem desconhecida, com ou sem azotemia. Gatos que apresentaram azotemia decorrente de quadro obstrutivo foram excluídos do estudo.

3.2 Coleta e acondicionamento de amostras

Amostras de sangue total foram coletadas e destinadas à detecção molecular de leptospiras por meio da PCR convencional. Amostras de soro foram destinadas à investigação de anticorpos anti-leptospiras por meio da técnica de MAT. As amostras que apresentaram amplificação e formação de banda em gel de agarose foram submetidas à realização de PCR quantitativa (qPCR), específica contra leptospiras patogênicas, para confirmação dos resultados.

Os tutores dos animais com infecção confirmada foram contatados para proceder reavaliação clínica dos animais e coleta de urina e sangue para confirmação da persistência da infecção. As amostras de urina e sangue obtidas nas reavaliações foram destinadas à PCR e isolamento do patógeno, e o soro sanguíneo à identificação de anticorpos anti-leptospiras. Em caso de confirmação da

persistência da infecção, os tutores foram instruídos a buscar orientação profissional para adoção de medidas terapêuticas cabíveis.

A inclusão do paciente no estudo foi realizada somente mediante a autorização do proprietário, por meio da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

As amostras de urina foram coletadas por micção espontânea, cateterismo uretral ou cistocentese, e quando destinadas ao cultivo e isolamento (reavaliações), foram coletadas apenas por cistocentese. As coletas de sangue foram feitas por punção venosa da veia jugular ou cefálica. Parte da amostra de sangue total foi armazenada em tubo com EDTA e destinadas à identificação de material genético de leptospiros patogênicos e cultura bacteriana. Separadas, acondicionadas, em duas porções: uma com EDTA e outra sem.

As amostras foram separadas e acondicionadas previamente pela equipe do laboratório de patologia clínica do HOVET-UNISA, sendo posteriormente retiradas para triagem através de consulta do prontuário eletrônico dos animais e realização do processo de extração de DNA e posterior amplificação por PCR convencional.

Amostras de urina e sangue obtidas nas reavaliações foram destinadas ao isolamento das leptospiros e foram semeadas em meio Ellinghausen-MacCullough-Johnson-Harris (EMJH) imediatamente após a coleta. As amostras de urina destinadas à reação de qPCR foram acrescidas de EDTA com concentração final de 10nM e incubadas por 30 minutos. As amostras foram centrifugadas a 10.000xg por 25 minutos a 25°C para sedimentação, sendo ressuspensas em 3mL de PBS estéril após descarte do sobrenadante (MIOTTO et al., 2018a).

3.3 Critérios diagnósticos

Foi considerada infecção aguda qualquer animal que apresentou: (1) resultados positivos à PCR convencional e posterior amplificação por qPCR; (2) titulação na MAT de 800 ou mais para qualquer sorovar (amostra única); ou (3) quando foi observado na MAT aumento de 2 diluições para qualquer sorovar, ou qualquer sorovar que teve aumento de títulos de 0 para 100 ou mais (amostras pareadas).

Para a identificação do provável sorogrupo infectante, foram adotados os seguintes critérios: (a) nos pacientes com apenas uma amostra, foi considerado o sorogrupo com maior titulação obtida; e (b) nos pacientes com amostras pareadas, foi considerado o sorogrupo com maior titulação na segunda avaliação sorológica (e não o sorogrupo em que foi detectada soroconversão entre a primeira e segunda avaliação) (MIOTTO *et al.*, 2017; MIOTTO *et al.*, 2018a).

3.4 Teste de soroaglutinação microscópica (MAT)

A MAT foi realizada utilizando um painel de 24 sorovares representando 20 sorogrupos, como descrito anteriormente (MIOTTO *et al.*, 2018a). Os títulos de corte foram determinados usando diluições até que o último poço mostrasse 50% de aglutinação. O ponto de corte para uma reação MAT positiva foi definido como título maior ou igual a 100) (Terrestrial Animal Health Code 31st edition, 2023; World Organization for Animal Health, 2023;).

3.5 Extração de DNA E Reação da polimerase em cadeia (PCR)

As amostras de urina foram centrifugadas (10.000xg, 25°C, 25min), e os pellets foram ressuspensos em 3 ml de solução salina tamponada com fosfato estéril (PBS, pH 7,2) antes do armazenamento a 4°C. O DNA foi extraído dentro de 48h após a coleta da amostra usando o Mini Kit de DNA genômico (Invitrogen™, Toronto, CA) de acordo com as instruções do fabricante.

Após extração de DNA, foi realizada amplificação parcial do gene 16S rRNA, que tem como alvo fragmento de 331 pb (PCR convencional) para triagem. Posteriormente, a detecção de leptospiros patogênicos foi realizada usando um ensaio quantitativo em tempo real que amplifica fragmento de 120bp do gene *lipI32*. Os primers (forward: 50-TCGCTGAAATRGGWGTTCGT-30; reverse: 50-TAAAGCCAGGACAAGCGCC-30), sonda (FAM-50-AAAGCCAGGACAAGCGCCG-30-MGB) e condições de ciclagem utilizadas foram previamente validados para detectar leptospiros patogênicos a partir de amostras de urina canina (MIOTTO *et al.*, 2017). Cada reação teve um volume final de 25µL, com 600µM de cada primer, 250nM da sonda, 1x TaqMan Master Mix

Universal II (Thermo Fisher Scientific Inc., Carlsbad, CA, EUA), água livre de DNase e 5µL do DNA extraído.

Para quantificação absoluta, ampliações de diluições seriadas de DNA genômico extraídas de *L. interrogans* sorovar Canicola, estirpe Hond Utrecht IV foram realizadas (curva-padrão) junto ao teste de qPCR das amostras clínicas. As leptospiros utilizadas para confecção da curva-padrão foram quantificadas usando uma câmara de contagem Petroff-Hausser, e o DNA extraído foi quantificado em duplicata usando o Fluorômetro Qubit 2 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Carlsbad, CA, EUA) para determinar o número de equivalentes genômicos (GE). Para preparar as curvas-padrão, o DNA extraído foi padronizado em uma concentração inicial de 1×10^6 GE / reação, seguido de diluições em série de 10 vezes até que 1×10^1 GE / reação ser alcançado. Todas as diluições da curva padrão foram testadas em triplicata, incluindo também um único controle negativo.

3.6 Cultura de leptospiros

Para o isolamento de leptospiros, 500µL de urina total foram semeados diretamente nos meios de cultura EMJH, e 500µL foram diluídos em solução salina estéril nas concentrações 1:10 e 1:100 e posteriormente semeadas em meio de cultura EMJH utilizando 500µL. Os tubos foram incubados a 28°C e observados semanalmente por cerca de seis semanas para verificação de anel de crescimento superficial (zona de Dinger) de leptospiros no meio. A confirmação da presença de leptospiros foi realizada pela visualização de espiroquetas em uma gota da amostra em microscópio de campo escuro com aumento de 200 vezes.

3.7 Análises estatísticas

Neste trabalho foi realizado uso de estatística descritiva por meio de medidas de tendência central (média e mediana) e de distribuição de frequências (frequências absolutas e relativas) com variáveis quantitativas.

4. RESULTADO

A partir dos critérios de elegibilidade estabelecidos no estudo, foram incluídos 76 (100%) animais.

Dentre os 76, 40 (52,6%), possuíam como hipótese diagnóstica (HD) doença renal crônica (grau I, II ou III), 11 (14,5%) animais com HD de alterações gastrointestinais (gastrite, colangiohepatite, doença inflamatória intestinal, fecaloma ou prolapso de reto), 10 (13,1%) animais com HD de neoplasias (linfoma, linfoma alimentar, leucemia, outras neoplasias), 9 (11,8%) animais com HD de doença do trato urinário inferior dos felinos (DTUIF) ou litíase (nefrolitíase, ureterolitíase ou urolitíase), 4 (5,3%) com HD de doença renal aguda ou glomerulonefrite, 3 (3,9%) animais com dermatopatias, 3 (3,9%) animais com doenças infecciosas (FIV, FeIV), 3 (3,9%) animais com alterações respiratórias (broncopneumonia ou complexo respiratório felino), 2 (2,6%) animais com HD de hemoparasitose, 2 (2,6%) animais com HD de intoxicação, 2 (2,6%) animais com HD de doença do disco intervertebral (DDIV), 2 (2,6%) animais com HD de alterações hormonais (Diabetes Mellitus ou hiperadrenocorticismo) e 1 (1,3%) animal com Complexo Gengivite Estomatite Felina (CGEF) (tabela 1).

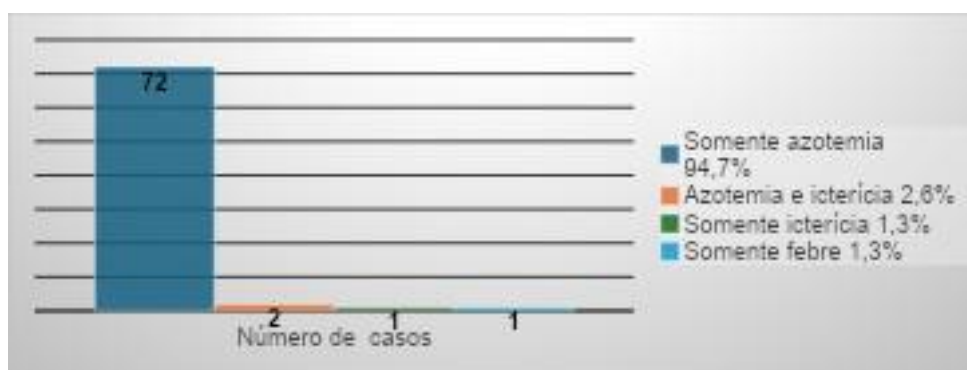
Tabela 1. Hipóteses diagnósticas dos animais incluídos no estudo.

HIPÓTESES DIAGNÓSTICA	CASOS	
	Número	Porcentagem
Doença renal crônica (grau I, II e III)	40	52,6%
Alterações gastrointestinais	11	14,5%
Neoplasias	10	13,1%
Doença do trato urinário inferior dos felinos	9	11,8%
Doença renal aguda ou glomerulonefrite	4	5,3%
Dermatopatias	3	3,9%
Doenças infecciosas	3	3,9%
Alterações respiratórias	3	3,9%
Hemoparasitose	2	2,6%
Intoxicação	2	2,6%
Doença do disco intervertebral	2	2,6%

Alterações hormonais	2	2,6%
Complexo gengivite estomatite felina	1	1,3%

Dos 76 (100%) animais incluídos no estudo, 72 (94,7%) apresentaram azotemia, 2 (2,6%) animais apresentaram azotemia e icterícia, 1 (1,3%) animal apresentou somente icterícia e 1 (1,3%) animal apresentou somente febre (gráfico 1).

Gráfico 1. Critérios de elegibilidade de animais incluídos no estudo.



Do total de animais incluídos, de acordo com os critérios de elegibilidade, foi possível obter amostras de sangue e soro sanguíneo de todos eles, que foram destinadas à detecção de leptospiras por PCR convencional e realização da MAT.

Nenhum dos animais apresentou anticorpos anti-leptospira na técnica de MAT. Já com relação à detecção molecular, foi obtida amplificação de fragmento do gene 16S em amostras de três dos 76 animais avaliados (3,9%).

Figura 1. Gel de agarose demonstrando amplificação de DNA leptospírico em amostras de sangue dos animais 1 e 3.



Fonte: do autor

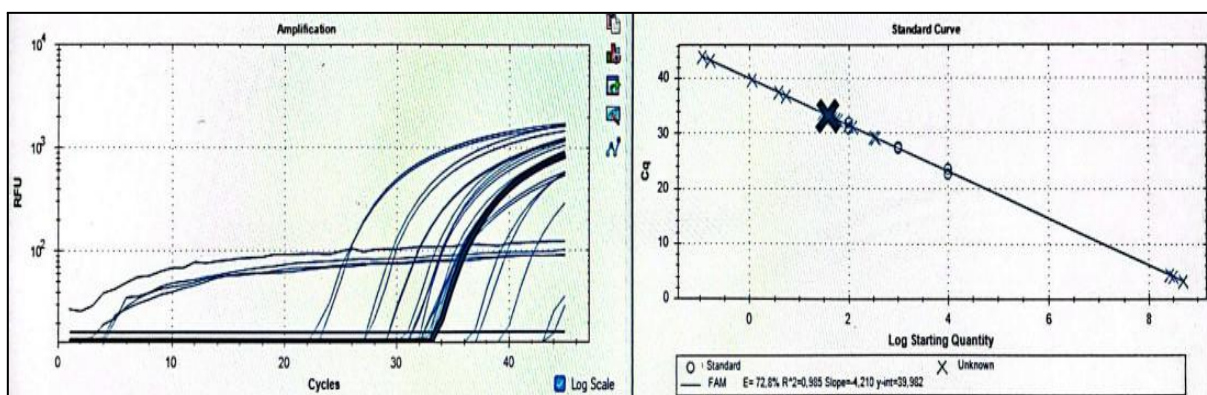
Figura 2. Gel de agarose demonstrando amplificação de DNA leptospírico em amostra de sangue do animal 2.



Fonte: do autor

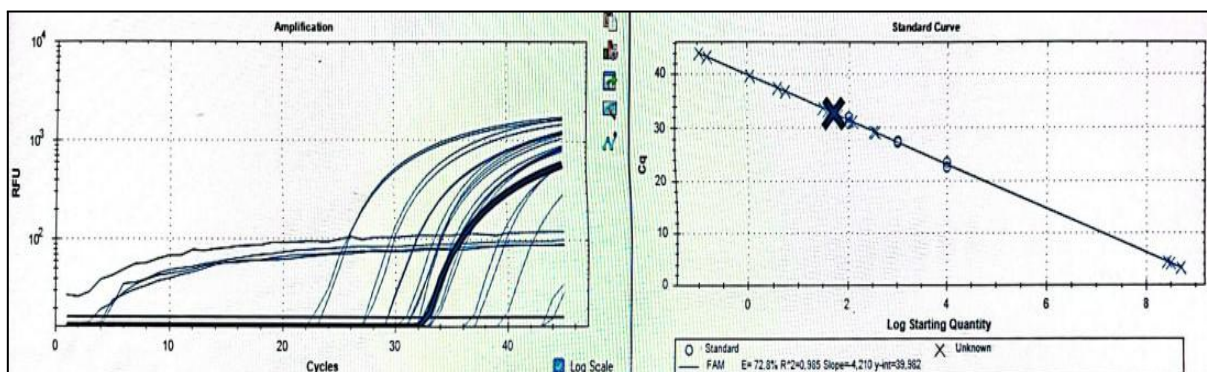
Dos três animais positivos à PCR, dois deles (Animal 1 e Animal 2) apresentaram amplificação de material genético no ensaio de qPCR para o gene *lip32*, confirmando a infecção aguda e a patogenicidade das leptospiras infectantes.

Figura 3. Curva de amplificação da qPCR do Animal 1.



Fonte: do autor

Figura 4. Curva de amplificação da qPCR do Animal 2.



Fonte: do autor

O animal 2 foi reavaliado 20 dias após a detecção de leptospiros no sangue, para tentativa de isolamento em amostra de urina e avaliação de soroconversão pela técnica de MAT. Não houve amplificação de DNA leptospírico em amostras de sangue e urina, nem a possibilidade de obtenção de isolamento em amostra de urina deste animal, impedindo o reconhecimento de qual sorogrupo a leptospira infectante pertencia. A avaliação de soro sanguíneo pela MAT revelou que não houve soroconversão de anticorpos anti-leptospira para o animal em questão.

4.1 Alterações clínico-laboratoriais dos animais com infecção confirmada

4.1.1 Caso 1

Na data de 07 de março de 2024 foi atendido, no Hospital Veterinário UNISA (HOVET UNISA), um felino macho, pelo curto, sem raça definida (SRD), com aproximadamente 4 anos de idade e peso corporal não especificado, histórico de fugas esporádicas e a presença de cinco contactantes felinos, tendo o último sido adotado há um mês. Deu entrada no serviço, proveniente de sua residência e acompanhado por tutor responsável, com quem reside, que observou a presença de episódios de tosse e sialorreia, com início há quatro dias e após 24 horas de eventual fuga do animal de seu domicílio, com permanência de, aproximadamente, 2 horas distante do lar. Referiu ainda que, a administração de vacinas (múltipla e antirrábica), vermífugo e ectoparasiticida encontravam-se desatualizados. Conforme relatado, o animal apresentava apetite seletivo (aceitando apenas alimento úmido), sem alterações como êmese, cianose, dispneia, espirros, afirmava ainda

normodipsia e urina dentro dos padrões de normalidade (cor, odor, quantidade e frequência).

Ao exame clínico, animal apresentava-se alerta, responsivo ao ambiente, sem evidências de lesões em pele, apresentava escore de condição corporal 5/9, linfonodos não-reativos, mucosas normocoradas, leve abdominalgia à palpação, hidratado, sem evidências de alterações em ausculta cardiopulmonar, com frequência cardíaca de 160 batimentos por minuto, frequência respiratória de 42 movimentos por minuto, tempo de preenchimento capilar de 2 segundos e temperatura retal de 39,7°C.

Foi realizada colheita de sangue para realização de hemograma, mensuração de bioquímica hepática e bioquímica renal (quadro 1). Foi nessa amostra de sangue que foi possível, a posteriori, e na ocasião da análise da realização dos testes previstos no presente estudo, identificar o DNA de leptospiros e realização da MAT, não apresentando soroconversão de anticorpos-antileptospiros.

Quadro 1. Resultados de exames laboratoriais dos Casos 1.

EXAMES	RESULTADO	RESULTADO
ERITROGRAMA		
Eritrócitos	7.35milhões/mm ³	-
Hematócrito	36%	-
LEUCOGRAMA		
Leucocitose	Não	-
Leucopenia	Não	-
Leucócitos	6.70mil/mm ³	-
Desvio a direita	Não	-
Desvio a esquerda	Não	-
Segmentados	4824.00µL	72%
Bastonetes	0µL	0%
Monocitose	Não	-
Monócitos	67.00µL	1%
Linfopenia	Não	-
Linfócitos	1974.00µL	22%
DISTÚRBO HEMORRÁGICO		
Plaquetas	237.000mil/mm ^{3*}	-
FUNÇÃO HEPÁTICA		

Alanina amino transferase (ALT)	42.20UI/L	-
Glutamil gama transferase (GGT)	1.33UI/L	-
Albumina	2.90mg/dL	-
Proteínas totais	7.87g/dL	-
FUNÇÃO RENAL		
Azotemia	Sim	-
Ureia	59.00mg/dL	-
Creatinina	1.86mg/dL	-
EXAME COMPLEMENTAR		
SNAP Fiv/Felv	Não reagente	-

*Valores de referência: Eritrócitos (5 a 10milhões/mm³); Hematócrito (24 a 45%); Leucócitos (5,5 a 19,5mil/mm³); Segmentados (1925 a 14625µL/35 a 75%); Bastonetes (0 a 300 µL/ 0 a 3%); Monócitos (55 a 780µL/1 a 4 %); Linfócitos (1500 a 7000µL/ 20 a 55%); Plaquetas (300 a 800mil/mm³); Alanino amino transferase (ALT) (6,0 a 83,0UI/L); Glutamil gama transferase (GGT) (1,3 a 5,1UI/L); Albumina (2.1 a 3.9mg/dL); Proteínas totais (5,4 a 7,8g/dL); Ureia (42.8 a 64.2mg/dL); Creatinina (0,8 a 1,6 mg/dL); Snap Fiv/Felv (Não reagente).

**Presença de agregado plaquetário.

Foi realizado ainda, radiografia de tórax, que evidenciou campos pulmonares com opacificação difusa de padrão brônquico, podendo esta alteração estar relacionada com broncopatia.

Diante do achado, o animal recebeu como tratamento nosocomial dipirona sódica 25mg/kg por via subcutânea e dexametasona 0,2 mg/kg por via subcutâneo, com posterior liberação para a residência, mediante orientação de tratamento domiciliar com prescrição de prednisolona 10 gotas, 1 vez ao dia, por 5 dias, inalação S.F0,9%/ por 7 dias e dipirona sódica 5 gotas por 3 dias.

Após notar o não agendamento ou comparecimento para retorno em consulta, foram realizadas inúmeras tentativas de contato com o responsável, foi somente após 90 dias da primeira consulta que logramos êxito em conversar com o Tutor que referiu melhora do quadro clínico apresentado inicialmente, associando tais manifestações a possível intoxicação por domissanitário.

4.1.2 Caso 2

Com primeira consulta em 10 de junho de 2024, foi realizado atendimento a felino macho, SRD, com aproximadamente 13 anos de idade e peso corporal de 6 kg. Conforme relato do tutor responsável, o animal apresentava disúria, polaquiúria e

êmese após alimentação, com início há quatro dias, relatou ainda que o quadro de alteração urinária já havia ocorrido anteriormente (histórico de cristalúria). Referiu ainda que, a administração de vacinas (múltipla e antirrábica), vermífugo e ectoparasiticida encontravam-se desatualizados.

Ao exame clínico, animal apresentava-se alerta, responsivo a manipulação e ao meio ambiente, sem evidências de lesões na pele e com bom estado geral. À palpação observou-se vesícula urinária com baixa repleção, discreta abdominalgia e sensibilidade em segmento de coluna toracolombar, ausculta cardíaca apresentava bulhas normofonéticas sem sopro, e em ausculta pulmonar, campos pulmonares limpos, frequência cardíaca de 216 batimentos por minuto, frequência respiratória com padrão eupneico, glicemia capilar de 121 mg/dl e tempo de preenchimento capilar de 2 segundos.

Foi realizado colheita de sangue para realização de hemograma, bioquímica hepática e bioquímica renal (quadro 2).

Quadro 2. Resultados de exames laboratoriais dos Casos 2.

EXAMES	RESULTADO	VALORES DE REFERÊNCIA
ERITROGRAMA		
Eritrócitos	8.72milhões/mm ³	-
Hematócrito	47%	-
LEUCOGRAMA		
Leucocitose	Não	-
Leucopenia	Não	-
Leucócitos	7.40mil/mm ³	-
Desvio a direita	Não	-
Desvio a esquerda	Não	-
Segmentados	5402.00µL	73%
Bastonetes	0µ	0%
Monocitose	Não	-
Monócitos	296.00µL	4%
Linfopenia	Sim	-
Linfócitos	888.00µL	12%
DISTÚRBIO HEMORRÁGICO		
Plaquetas	457.000mil/mm ³	-
FUNÇÃO HEPÁTICA		

Alanina amino transferase (ALT)	47.90UI/L	-
Glutamil gama transferase (GGT)	1.52UI/L	-
Albumina	2.62mg/dL	-
Proteínas totais	7.20g/dL	-
FUNÇÃO RENAL		
Azotemia	Sim	-
Ureia	53.50mg/dL	-
Creatinina	1.80mg/dL	-
EXAME COMPLEMENTAR		
SNAP Fiv/Felv	-	-

*Valores de referência: Eritrócitos (5 a 10milhões/mm³); Hematócrito (24 a 45%); Leucócitos (5,5 a 19,5mil/mm³); Segmentados (1925 a 14625µL/35 a 75%); Bastonetes (0 a 300 µL/ 0 a 3%); Monócitos (55 a 780µL/1 a 4 %); Linfócitos (1500 a 7000µL/ 20 a 55%); Plaquetas (300 a 800mil/mm³); Alanino amino transferase (ALT) (6,0 a 83,0UI/L); Glutamil gama transferase (GGT) (1,3 a 5,1UI/L); Albumina (2.1 a 3.9mg/dL); Proteínas totais (5,4 a 7,8g/dL); Ureia (42.8 a 64.2mg/dL); Creatinina (0,8 a 1,6 mg/dL); Snap Fiv/Felv (Não reagente).

Em exame ultrassonográfico de abdome e pelve evidenciou-se espessamento de paredes de duodeno, jejuno e íleo, podendo estar associado a processo inflamatório com diferencial para infiltrado neoplásico, rins com perda moderada da definição corticomedular, cortical espessa e com ecogenicidade elevada em ambos os rins.

Diante do achado, foi prescrito, como tratamento domiciliar, dipirona sódica 6 gotas, 1 vez ao dia, por 5 dias, Cerênia 24 mg, meio comprimido uma vez ao dia, por 4 dias e prednisolona 5 mg, 1 comprimido uma vez ao dia, por 7 dias, sendo o tutor orientado a respeito de manejo alimentar adequado (rações de excelente qualidade e também dietas úmidas, com o objetivo de diminuir a formação de cálculos urinários e aumentar a oferta de líquidos afim de evitar quadros de obstrução uretral, manejo de estresse (sedentarismo, passeios de carro ou ambientes barulhentos, mudanças no ambiente do animal, estímulo a brincadeiras com brinquedos dos quais o animal demonstre interesse) e estímulo a perda de peso.

Na data de 24 de junho de 2024, em atendimento para retorno pré agendado, animal apresentava-se alerta e em bom estado geral e, conforme relato do tutor, com melhora do quadro de estrangúria.

Em 13 de setembro de 2024, em novo atendimento, tutor referiu que o animal apresenta quadro emético progressivo após a alimentação há aproximadamente 7

dias, presença de secreção nasal de aspecto hialino, secreção ocular, periúria e disquezia. Relatou ainda que o animal possuía contato com outros felinos errantes.

Ao exame clínico, animal apresentava escore de condição corporal 8/9, mucosas normocoradas, hidratado (5%), linfonodos não reativos, frequência cardíaca de 200 batimentos por minuto, frequência respiratória de 30 movimentos por minuto, glicemia capilar de 86 mg/dl, tempo de preenchimento capilar de 2 segundos e temperatura retal de 38.1°C.

Foi realizado nova colheita de sangue para realização de hemograma, bioquímica hepática e bioquímica renal (quadro 3). Foi nessa amostra de sangue que foi possível, a posteriori e na ocasião da análise da realização dos testes previstos no presente estudo, identificar o DNA de leptospiros. No entanto, diante da realização da MAT não houve soroconversão de anticorpos-antileptospiros.

Quadro 3. Resultados de exames laboratoriais dos Casos 2.

EXAMES	RESULTADO	VALORES DE REFERÊNCIA
ERITROGRAMA		
Eritrócitos	8.32milhões/mm ³	-
Hematócrito	44%	-
LEUCOGRAMA		
Leucocitose	Não	-
Leucopenia	Não	-
Leucócitos	11.00mil/mm ³	-
Desvio a direita	Não	-
Desvio a esquerda	Não	-
Segmentados	7810.00µL	71%
Bastonetes	0µ	0%
Monocitose	Não	-
Monócitos	220.00µL	2%
Linfopenia	Sim	-
Linfócitos	770.00µL	7%
DISTÚRBO HEMORRÁGICO		
Plaquetas	414.000mil/mm ³	-
FUNÇÃO HEPÁTICA		
Alanina amino transferase (ALT)	44.50UI/L	-
Glutamil gama transferase (GGT)	3.92UI/L	-

Albumina	2.46mg/dL	-
Proteínas totais	7.00g/dL	-
FUNÇÃO RENAL		
Azotemia	Sim	-
Ureia	58.30mg/dL	-
Creatinina	1.55mg/dL	-
EXAME COMPLEMENTAR		
SNAP Fiv/Felv	Não reagente	-

*Valores de referência: Eritrócitos (5 a 10milhões/mm³); Hematócrito (24 a 45%); Leucócitos (5,5 a 19,5mil/mm³); Segmentados (1925 a 14625µL/35 a 75%); Bastonetes (0 a 300 µL/ 0 a 3%); Monócitos (55 a 780µL/1 a 4 %); Linfócitos (1500 a 7000µL/ 20 a 55%); Plaquetas (300 a 800mil/mm³); Alanino amino transferase (ALT) (6,0 a 83,0UI/L); Glutamil gama transferase (GGT) (1,3 a 5,1UI/L); Albumina (2.1 a 3.9mg/dL); Proteínas totais (5,4 a 7,8g/dL); Ureia (42.8 a 64.2mg/dL); Creatinina (0,8 a 1,6 mg/dL); Snap Fiv/Felv (Não reagente).

Como tratamento nosocomial, foram administrados cerênia 0,1 mg/kg, dipirona 25 mg/kg e dexametasona 0,15 mg/kg, todos por via subcutânea, já para tratamento domiciliar foram prescritos Gaviz V 1 mg/kg, duas vezes ao dia, por 5 dias, Cerênia 1 mg/kg uma vez ao dia, por 4 dias e ondansetrona 1mg/kg ao dia, por 4 dias.

Em 03 de outubro de 2024, último registro em prontuário, responsável referiu que o animal apresentava melhora do quadro durante administração do corticóide (prednisolona), porém, com a descontinuidade da medicação observava recidiva do quadro de disúria, estrangúria, tenesmo vesical e periúria, alegou não ter presenciado novos episódios de êmese.

Em exame clínico, animal apresentava bom estado geral, normorexia e normoquezia.

Em conversa com o tutor responsável, explicado sobre o teor do presente estudo, solicitando-se autorização para coleta de urina por cistocentese (aproveitando-se a oportunidade de retorno para realização de ultrassonografia abdominal) e coleta de amostras de sangue em tubo com EDTA e em tubo com conservante para aquisição de soro.

Foi realizado, no entanto, novos testes de qPCR de sangue e urina, MAT do soro sanguíneo e cultivo de leptospiras em urina. Não houve amplificação de DNA leptospírico nas amostras de sangue e urina, soroconversão de anticorpos-antileptospiras ou isolamento de leptospiras.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo identificou felinos domésticos sintomáticos com presença de DNA de leptospiras em amostras de sangue, sugerindo uma provável infecção leptospírica aguda nos casos avaliados, cujas manifestações clínicas foram inespecíficas para um quadro agudo de leptospirose. No entanto, houve amplificação de DNA de leptospiras no ensaio de PCR convencional, posteriormente sendo confirmado por qPCR em amostras de sangue dos dois animais.

Na literatura científica, são escassos os relatos de leptospirose aguda na espécie felina, e alguns destes trabalhos apontam que os animais apresentaram manifestações clínicas distintas às apresentadas por outras espécies, ocorrendo geralmente de forma leve ou inaparente (LANG & LANG, 2014; MURILLO *et al.*, 2020). Este fato dificulta o diagnóstico de leptospirose aguda em gatos que chegam ao atendimento na clínica veterinária. Ademais, rotineiramente a doença não é considerada como suspeita inicial ou mesmo incluída como parte de um diagnóstico diferencial no atendimento, aumentando deste modo, os riscos aos envolvidos no contato direto e indireto com o animal (TAM *et al.*; 2024).

Outra característica importante, que também contribui para a dificuldade diagnóstica da leptospirose nas diferentes espécies, é o seu padrão bifásico (fase de leptospiremia ou septicêmica, fase imune e leptospirúria). Classicamente, a fase leptospirêmica da doença, ocorre na primeira semana. Em seguida, devido a resposta do sistema imunológico do hospedeiro e a produção de anticorpos, inicia-se a fase imune, que ocorre, geralmente, da segunda a quarta semana do início da doença, sendo marcada pela diminuição do número de bactérias na circulação sanguínea e pelo aumento gradual da titulação de anticorpos, com possível evolução para a colonização dos túbulos renais por leptospiras e posterior disseminação para o meio ambiente de forma intermitente por meio da urina (MURILLO *et al.*, 2020; PHILLIP *et al.*, 2020).

Apesar de bem estabelecida as fases da doença, o momento exato em que ocorreu a exposição ao patógeno em geral é desconhecido, ademais, variações no tempo das fases de leptospiremia, fase imune e leptospirúria também podem ocorrer aumentando os desafios para o correto diagnóstico (PHILLIP *et al.*, 2020; THIELEN *et al.*, 2024).

Em recente revisão sistemática com metanálise realizada por Miotto *et al.*, (2024), de 798 amostras de sangue de gatos analisadas, pelo menos 9,5% apresentaram positividade na PCR para leptospiros. Além disso, na avaliação de urina ou rim, utilizando-se o ensaio de PCR, encontrou-se uma positividade de 6,2% para leptospiros em um total de 2251 animais, demonstrando que a espécie além de suscetível ao patógeno, oferece potencial risco zoonótico, por atuar como portadora da doença, albergando leptospiros por longos períodos nos túbulos renais, podendo disseminá-las ao meio ambiente (ALASHRAF *et al.*, 2020).

Conforme apontado por Chan *et al.* (2014), gatos com baixa titulação ou mesmo titulação indetectável de anticorpos anti-leptospira foram capazes de eliminar DNA leptospiral na urina. Posteriormente, Alashraf *et al.* (2020), demonstraram que três a cada quatro gatos que apresentaram cultura de rim e urina positiva para *Leptospiras* patogênicas, não desenvolveram soroconversão de anticorpos anti-leptospiros. Ainda, conforme encontrado por Tam *et al.* (2024), em estudo realizado em Hong Kong, com gatos comunitários e domiciliados, demonstraram que alguns animais apresentavam leptospirose e titulação de anticorpos anti-leptospira negativa.

Ainda, como destacado por Miotto *et al.* (2024), pelo menos 9 gatos assintomáticos apresentaram cultura de urina positiva para leptospiros patogênicas. Os resultados positivos obtidos através da qPCR de sangue, no presente estudo, demonstram que a crescente suspeita e preocupação a respeito do papel desempenhado pela espécie felina na epidemiologia da leptospirose deve ser considerada.

Embora seja necessária uma abordagem cautelosa diante dos resultados encontrados nos experimentos de qPCR envolvendo os dois animais, não se pode ignorar os mesmos, haja vista, o DNA de leptospiros patogênicos encontrados no sangue, oferecendo riscos diretos e indiretos a todos os envolvidos na manipulação e assistência prestada aos animais, podendo inclusive gerar contaminações ambientais importantes, ampliando a disseminação de leptospiros e gerando repercussões negativas (DORSCH *et al.*, 2020).

Nos dois casos relatados, os animais apresentaram somente azotemia discreta. Febre, icterícia ou alterações no hemograma e em enzimas hepáticas estavam ausentes. O Animal do caso 1, apresentava tosse e sialorreia como manifestação clínica, e também alteração em exame de radiografia de tórax,

sugestivo de quadro brônquico. Já no caso 2, o Animal apresentava disúria, polaquiúria, êmese e alterações em exame ultrassonográfico de abdome sugestivas de nefropatia e doença inflamatória intestinal/neoplasia. Em ambos os casos, os animais possuíam histórico de fugas e contato com outros contactantes errantes. Embora esse histórico isolado não possa ser apontado como fator decisivo nos resultados obtidos nos ensaios moleculares aplicados no presente estudo, deve ser levado em consideração e melhor explorado, pois, conforme apontado por Ricardo *et al.* (2023) e Tam *et al.* (2024) felinos que possuem acesso a rua tem cerca de três vezes mais predisposição à infectar-se com leptospiros quando comparados com animais domiciliados.

Não foi possível detectar anticorpos anti-leptospira em nenhum dos dois animais positivos à qPCR, nem mesmo em amostra coletada do animal que foi reavaliado 20 dias após a detecção do patógeno no sangue. Trabalhos recentes investigaram a capacidade de imunoevasão desempenhada por leptospiros patogênicos. Em contribuição, Navas-Yust *et al.* (2023), Bonhomme e Werts (2022) e Fraga, Isaac e Barbosa (2016) detectaram a utilização, pela bactéria, de diversos mecanismos que variaram desde reguladores endógenos do sistema complemento do hospedeiro, até mesmo a capacidade de escapar de receptores de reconhecimento de lipopolissacarídeos (LPS). Tais mecanismos podem implicar na especificidade de resposta imune do hospedeiro, contribuindo inclusive para coevolução entre hospedeiro e patógeno, podendo desse modo comprometer uma resposta imune mais robusta, justificando uma possível falta de soroconversão em algumas situações.

De acordo com Putz e Nally (2020), um mesmo sorovar pode suscitar diferentes respostas a depender do hospedeiro infectado, gerando desta maneira quadros e respostas que variam desde manifestações leves ou inaparentes, até quadros mais graves. Ademais, os autores defendem que o quadro de infecção aguda ou crônica por leptospirose, depende da agilidade e austeridade em que o sistema imunológico do hospedeiro possui em conter as leptospiros invasoras.

Outra hipótese, destacada por alguns trabalhos, parte da teoria de que os gatos apresentam uma resposta imune rápida, com baixos títulos de anticorpos e posterior decaimento acelerado, dificultando desta maneira, à possibilidade de detecção de títulos de anticorpos anti-leptospiros (ANDYTAS *et al.*, 2024; SPRIBLER

et al., 2019), tal fenômeno também foi observado em humanos conforme relatado por Thielen *et al.* (2024).

Entretanto, faz-se necessário mais estudos experimentais no que diz respeito a investigações relacionadas a resposta imune dos gatos diante de uma possível exposição a leptospiros patogênicas, de modo a aumentar a robustez de tais teorias. Ademais, o teste de soroaglutinação microscópica para gatos é realizado, geralmente, com diferentes valores de corte, como 1:20 (DONATO *et al.*, 2022), 1:50 (BOURASSI *et al.*, 2021), 1:100 (ALASHRAF *et al.*, 2020; RODRIGUEZ *et al.*, 2014; TAM *et al.*, 2024) e 1:400 (PHILLIP *et al.*, 2020), distanciando deste modo, a possibilidade de estudos comparativos e de padronização do método para a espécie em questão (DONATO *et al.*, 2022; WEIS *et al.*, 2016).

O resultado negativo na qPCR de sangue para a segunda amostra do animal 2, provavelmente indica que o animal já não estava na fase de leptospiremia. A ausência de colônias no cultivo de urina pode ser atribuída à falta de leptospiros na amostra, conforme a ausência de amplificação de DNA leptospírico no teste de qPCR.

O presente estudo apresentou alguns fatores limitantes, dentre os quais podemos citar a quantidade reduzida de amostras de soro obtidas para avaliação sorológica dos animais que apresentaram resultados negativos para a qPCR. Sendo este evento justificado por questões técnicas como a aquisição de volume insuficiente de soro para análise. Outra dificuldade encontrada que contribuiu de certa forma como fator limitante é o não retorno dos tutores com seus animais para reavaliação, dificultando o acompanhamento do caso em questão. E o último apontamento é a impossibilidade que encontramos em realizar a qPCR para todas as 76 (100%) amostras de sangue. Deste modo, é de suma importância a continuidade da pesquisa e a expansão dos critérios de inclusão além dos pré-definidos (azotemia, febre e icterícia), pois de fato a detecção de leptospirose aguda na espécie felina é um desafio, e no contexto de Uma Só Saúde, é essencial buscar a compreensão do real papel desempenhado pelos gatos na epidemiologia da leptospirose, pois como demonstrado por diferentes trabalhos, a espécie é capaz de eliminar bactérias viáveis no meio ambiente, podendo gerar contaminações ambientais, com repercussões na saúde humana e animal.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo permitem inferir que, embora o papel dos gatos na epidemiologia da leptospirose ainda seja incerto, gatos podem ser infectados de forma aguda por leptospirosas sem que apresentem padrões sintomatológicos evidentes. A detecção de DNA de leptospirosas patogênicas no sangue de gatos desperta preocupação, mesmo que não tenha sido possível estabelecer uma correlação entre manifestações clínico-laboratoriais e leptospirose aguda com base nas amostras analisadas.

Ainda que os resultados demandem cautela, os riscos diretos e indiretos para todos os envolvidos na manipulação dos animais não podem ser negligenciados. Assim, torna-se evidente a necessidade de desenvolver mais estudos que adotem metodologias semelhantes para explorar as características clínico-laboratoriais da leptospirose em gatos. Esse avanço permitirá que a doença seja considerada um diagnóstico diferencial em quadros clínicos apresentados por gatos na prática veterinária, lançando luz sobre a real ocorrência da infecção e o impacto dessa enfermidade na saúde e bem estar de felinos domésticos.

REFERÊNCIAS

ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. Leptospira and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3-4, p. 287-296, 2010.

doi:10.1016/j.vetmic.2009.03.012. Acesso em: 23/04/2023.

ALASHRAF, A. R. *et al.* Serological Detection of Anti-Leptospira Antibodies in Shelter Cats in Malaysia. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 34, p. 10-13, 2019.

doi:10.1053/j.tcam.2018.12.002. Acesso em:08/08/2023.

ALASHRAF, A. R. *et al.* First report of pathogenic Leptospira spp. isolated from urine and kidneys of naturally infected cats. **PLOS ONE**, v. 15, n. 3, 2020.

doi.org/10.1371/journal.pone.0230048. Acesso em:15/08/2023.

ANDITYAS, M. *et al.* Feline leptospirosis prevalence worldwide: A systematic review and meta-analysis of diagnostic approaches. **Veterinary World**, p. 255-272, 2024.

doi:10.14202/vetworld.2024.255-272. Acesso em:08/08/2024.

ARBER, W. Current topics in microbiology and immunology. **Immunological Communications**, v. 6, n. 2, p. 207–213, 1977.

Acesso em 23/04/2023.

ARBOUR, J.; BLAIS, M.; CARIOTO, L.; SYLVESTRE, D. Clinical Leptospirosis in Three Cats (2001–2009). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 48, n. 4, p. 256-260, 2012.

doi:10.5326/JAAHA-MS-5748. Acesso em:05/05/2023.

AZÓCAR-AEDO, L.; MONTI, G. Meta-Analyses of Factors Associated with Leptospirosis in Domestic Dogs. **Zoonoses and Public Health**, v. 63, n. 4, p. 328-336, 2015.

doi:10.1111/zph.12236. Acesso em: 05/05/2023.

AZÓCAR-AEDO, L.; MONTI, G.; JARA, R. Leptospira spp. in Domestic Cats from Different Environments: Prevalence of Antibodies and Risk Factors Associated with the Seropositivity. **Animals**, v. 4, n. 4, p. 612-626, 2014a.

doi:10.3390/ani4040612 Acesso em: 23/05/2023.

AZÓCAR-AEDO, L.; SMITS, H.; MONTI, G. Leptospirosis in dogs and cats: epidemiology, clinical disease, zoonotic implications and prevention. **Archivos de medicina veterinaria**, v. 46, n. 3, p. 337-348, 2014b.

doi.org/10.4067/S0301-732X2014000300002. Acesso em:05/05/2023.

BEAUDU-LANGE, C.; LANGE, E. Unusual clinical presentation of leptospirosis in a cat. **Revue Vétérinaire Clinique**, v. 49, n. 3, p. 115-122, 2014.

DOI: 10.1016/j.anicom.2014.05.001. Acesso em:01/09/2023.

BHARTI, A. R. *et al.* Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 12, p. 757-771, 2003.

doi:10.1016/s1473-3099(03)00830-2. Acesso em:15/08/2023.

BONHOMME, D.; WERTS, C. Host and Species-Specificities of Pattern Recognition Receptors Upon Infection With *Leptospira interrogans*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, 2022.

doi.org/10.3389/fcimb.2022.932137. Acesso em:09/11/2023.

CERQUEIRA, G. M.; PICARDEAU, M. A century of *Leptospira* strain typing. **Infection Genetics and Evolution**, v. 9, n. 5, p. 760-768, 2009.

doi:10.1016/j.meegid.2009.06.009. Acesso em:25/06/2023.

CHAN, K.; HSU, Y.; HU, W.; PAN, M.; LAI, J.; HUANG, K.; CHOU, S. Serological and PCR Detection of Feline *Leptospira* in Southern Taiwan. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 14, n. 2, p. 118-123, 2014.

doi:10.1089/vbz.2013.1324. Acesso em:01/10/2024.

CHIRATHAWORN, C. *et al.* Interpretation of microscopic agglutination test for leptospirosis diagnosis and seroprevalence. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, p. S162-S164, 2014.

doi:10.12980/APJTB.4.2014C580. Acesso em:30/06/2023.

COSTA, F. *et al.* Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. e0003898, 2015.

doi:10.1371/journal.pntd.0003898. Acesso em:10/10/2024.

DATASUS. (2022). tabnet.datasus.gov.br/tabnet/tabnet.htm. tabnet.datasus.gov.br Disponível em: [https://www.google.com/search?q=DATASUS.+\(2022\)](https://www.google.com/search?q=DATASUS.+(2022)). Acesso em:15/08/2023.

DONATO, G. *et a.* *Leptospira* spp. Prevalence in Cats from Southern Italy with Evaluation of Risk Factors for Exposure and Clinical Findings in Infected Cats. **Pathogens**, v. 11, n. 10, p. 1129, 2022.

doi:10.3390/pathogens11101129. Acesso em:20/10/2024.

DORSCH, R. *et al.* Cats shedding pathogenic *Leptospira* spp. -An underestimated zoonotic risk?. **PLOS ONE**, v. 15, n. 10, p. 1-17, 2020. Acesso em:05/07/2023.

FINK, J. M. *et al.* Evaluation of three 5' exonuclease-based real-time polymerase chain reaction assays for detection of pathogenic *Leptospira* species in canine urine. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 27, n. 2, p. 159-166, 2015.

doi:10.1177/1040638715571360. Acesso em:30/06/2023.

FRAGA, T. R.; ISAAC, L.; BARBOSA, A. S. Complement Evasion by Pathogenic *Leptospira*. **Frontiers in Immunology**, v. 7, 2016.

doi:10.3389/fimmu.2016.00623. Acesso em:05/05/2023.

FRAUNE, C. K.; SCHWEIGHAUSER, A.; FRANCEY, T. Evaluation of the diagnostic value of serologic microagglutination testing and a polymerase chain reaction assay for diagnosis of acute leptospirosis in dogs in a referral center. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 242, n. 10, p. 1373-1380, 2013.

doi:10.2460/javma.242.10.1373. Acesso em:10/07/2023.

GUERNIER, V. *et al.* Human Leptospirosis on Reunion Island, Indian Ocean: Are Rodents the (Only) Ones to Blame?. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 6, p. e0004733, 2016.

doi.org/10.1371/journal.pntd.0004733. Acesso em:25/05/2023.

GREENE, C. E., SYKES, J. E., MOORE, G. E., GOLDSTEIN, R. E., & SCHULTZ, R. D. Leptospirese. *In: Greene. Doenças infecciosas em cães e gatos*. 4ªed.Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. Capítulo 42, p.454-461.

HAAKE, D. A., & LEVETT, P. N. Leptospira and leptospirosis. **Journal of Biological Education**. v. 25, n. 3, 2015a.

<https://doi.org/10.1080/00219266.1991.9655201>

HAAKE, D. A.; LEVETT, P. N. Leptospirosis in Humans. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, p. 65-97, 2014b.

[doi:10.1007/978-3-662-45059-8_5](https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_5). Acesso em:10/05/2023.

HARKIN, K. R.; ROSHTO, Y. M.; SULLIVAN, J. T. Clinical application of a polymerase chain reaction assay for diagnosis of leptospirosis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 222, n. 9, p. 1224-1229, 2003.

[doi:10.2460/javma.2003.222.1224](https://doi.org/10.2460/javma.2003.222.1224). Acesso em:01/06/2023.

HARTMANN, K.; WEIS, S. Infektionen mit Leptospiren bei der Katze. **Tierärztliche Praxis Ausgabe K Kleintiere Heimtiere**, v. 45, n. 02, p. 103-108, 2017.

[doi:10.15654/TPK-160912](https://doi.org/10.15654/TPK-160912). Acesso em:20/08/2023.

HARTMANN, K. *et al.* Leptospira Species Infection in Cats: ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 15, n. 7, p. 576-581, 2013.

[doi:10.1177/1098612X13489217](https://doi.org/10.1177/1098612X13489217). Acesso em:20/08/2023.

HOOKEY, J. V. Leptospira and leptospirosis. **Journal of Biological Education**, v. 25, n. 3, p. 169-172, 1991.

[doi:10.1016/j.vetmic.2009.03.012](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.012). Acesso em:05/05/2023.

IRIS. Treatment recommendations for chronic kidney disease in cats. 2019.

Disponível em:

http://www.iris-kidney.com/pdf/IRIS_CAT_Treatment_Recommendations_2019.pdf.

Acesso em: 20/07/2024.

LANG, C.B.; LANG, E. Unusual clinical presentation of leptospirosis in a cat. **Clinique veterinaire**. V49, p.115-122, 2014.

doi.org/10.1016/j.anicom.2014.05.001. Acesso em: 11/09/2024.

LEHMANN *et al.* Leptospiral pathogenomics. **Pathogens**. v. 3, n. 2, p. 280-308. 10. 2014, [doi:10.3390/pathogens3020280](https://doi.org/10.3390/pathogens3020280). Acesso em:01/05/2023.

LEVETT, P. N. **Leptospirosis**. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 296-326, 2001.

doi:10.1128/CMR.14.2.296-326.2001. Acesso em:15/05/2023.

MASON, R. W.; KING, S. J.; MCLACHLAN, N. M. Suspected leptospirosis in two cats. **Australian Veterinary Journal**, v. 48, n. 11, p. 622-623, 1972. doi:10.1111/j.1751-0813.1972.tb05088.x. Acesso em:20/05/2023.

MÉRIEN, F. *et al.* Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 9, p. 2219-2224, 1992. doi:10.1128/jcm.30.9.2219-2224.1992. Acesso em:05/05/2023.

MIOTTO, B. A. *et al.* Current knowledge on leptospirosis in cats: A systematic review with metanalysis on direct detection, serological response, and clinical data. **Research in Veterinary Science**, v. 174, p. 105292, 2024. doi:10.1016/j.rvsc.2024.105292. Acesso em:08/07/2024.

MIOTTO, B. A. *et al.* Diagnosis of acute canine leptospirosis using multiple laboratory tests and characterization of the isolated strains. **BMC Veterinary Research**, v. 14, n. 1, 2018a. doi.org/10.1186/s12917-018-1547-4. Acesso em:10/07/2023.

MIOTTO, B. A. *et al.* Development and validation of a modified TaqMan based real-time PCR assay targeting the *lipI32* gene for detection of pathogenic *Leptospira* in canine urine samples. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 584-590, 2018b. doi:10.1016/j.bjm.2017.09.004. Acesso em:10/07/2023.

MIOTTO, B. A., DA HORA, A. S., TANIWAKI, S. A., BRANDÃO, P. E., HEINEMANN, M. B., & HAGIWARA, M. K. (2017). Development and validation of a modified TaqMan based real-time PCR assay targeting the *lipI32* gene for detection of pathogenic *Leptospira* in canine urine samples. **Brazilian Journal of Microbiology**. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.09.004>. Acesso em:05/09/2023.

MURILLO, A. *et al.* Leptospirosis in cats: Current literature review to guide diagnosis and management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 22, n. 3, p. 216-228, 2020. doi:10.1177/1098612X20903601. Acesso em:20/08/2023.

MURILLO, A. *et al.* *Leptospira* Detection in Cats in Spain by Serology and Molecular Techniques. International. **Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 5, p. 1600, 2020. doi:10.3390/ijerph17051600. Acesso em:20/08/2023.

MYLONAKIS, M. E. *et al.* Leptospiral seroepidemiology in a feline hospital population in Greece. **Veterinary Record**, v. 156, n. 19, p. 615-616, 2005. doi:10.1136/vr.156.19.615. Acesso em: 15/08/2023.

NAING, C. *et al.* Risk factors for human leptospirosis following flooding: A meta-analysis of observational studies. **PLOS ONE**, v. 14, n. 5, p. e0217643, 2019. doi.org/10.1371/journal.pone.0217643. Acesso em:20/08/2023.

NAVAS-YUSTE, S. *et al.* The structure of *Leptospira interrogans* GAPDH sheds light into an immunoevasion factor that can target the anaphylatoxin C5a of innate immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 14, 2023.
doi.org/10.3389/fimmu.2023.1190943. Acesso em:10/07/2024.

PHILIP, N. *et al.* Combined PCR and MAT improves the early diagnosis of the biphasic illness leptospirosis. **PLOS ONE**, v. 15, n. 9, p. e0239069, 2020.
doi:10.1371/journal.pone.0239069. Acesso em:08/08/2023.

PINTO, P. S.; LIBONATI, H.; LILENBAUM, W. A systematic review of leptospirosis on dogs, pigs, and horses in Latin America. **Tropical Animal Health and Production**, v. 49, n. 2, p. 231-238, 2016.
doi:10.1007/s11250-016-1201-8. Acesso em:30/06/2023.

PUTZ, E. J.; NALLY, J. E. Investigating the Immunological and Biological Equilibrium of Reservoir Hosts and Pathogenic *Leptospira*: Balancing the Solution to an Acute Problem? **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2020.
doi.org/10.3389/fmicb.2020.02005. Acesso em:20/10/2024.

REAGAN, K. L.; SYKES, J. E. Diagnosis of Canine Leptospirosis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v. 49, n. 4, p. 719-731, 2019.
doi:10.1016/j.cvsm.2019.02.008. Acesso em:25/06/2023.

RICARDO, T. *et al.* Leptospiral infection in domestic cats: Systematic review with meta-analysis. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 212, p. 105851, 2023.
doi:10.1016/j.prevetmed.2023.105851. Acesso em:23/09/2023.

RODRIGUEZ, J. *et al.* Serologic and Urinary PCR Survey of Leptospirosis in Healthy Cats and in Cats with Kidney Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 28, n. 2, p. 284-293, 2014a.
doi: 10.1111/jvim.12287. Acesso em:20/08/2023.

RODRIGUEZ, J., BLAIS, M.-C.-C., LAPOINTE, C., ARSENAULT, J., CARIOTO, L., & HAREL, J. Serologic and urinary PCR survey of leptospirosis in healthy cats and in cats with kidney disease. **J Vet Intern Med**, 28(2), 284–293, 2014b.
https://doi.org/10.1111/jvim.12287. Acesso em:22/05/2023.

SCHULLER, S. *et al.* European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats. **Journal of Small Animal Practice**, v. 56, n. 3, p. 159-179, 2015.
doi:10.1111/jsap.12328. Acesso em:20/06/2023.

SHOPHET, R. A serological survey of leptospirosis in cats. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 27, n. 11, p. 236-246, 1979.
doi:10.1080/00480169.1979.34662. Acesso em:01/05/2023.

SHROPSHIRE, S. B. *et al.* Evaluation of the *Leptospira* species microscopic agglutination test in experimentally vaccinated cats and *Leptospira* species seropositivity in aged azotemic client-owned cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 18, n. 10, p. 768-772, 2016.

doi:10.1177/1098612X15593902. Acesso em:01/09/2023.

SPRIßLER, F. *et al.* Leptospira infection and shedding in cats in Thailand. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 66, n. 2, p. 948-956, 2019. doi:10.1111/tbed.13110. Acesso em:15/08/2023.

SYKES, J. E. *et al.* Role of Diagnostics in Epidemiology, Management, Surveillance, and Control of Leptospirosis. **Pathogens**, v. 11, n. 4, p. 395, 2022a. doi:10.3390/pathogens11040395. Acesso em:02/05/2023.

SYKES, J. E. *et al.* Understanding leptospirosis: application of state-of-the-art molecular typing tools with a One Health lens. **American Journal of Veterinary Research**, v. 83, n. 10, 2022. doi.org/10.2460/ajvr.22.06.0104. Acesso em:25/06/2023.

SYKES, J. *et al.* 2010 ACVIM Small Animal Consensus Statement on Leptospirosis: Diagnosis, Epidemiology, Treatment, and Prevention. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 25, n. 1, p. 1-13, 2010. doi:10.1111/j.1939-1676.2010.0654.x. Acesso em:25/08/2023.

TAM, W. Y. J. *et al.* Seroreactivity against Leptospira spp. differs between community cats and privately-owned cats in Hong Kong. **One Health**, v. 19, p. 100851, 2024. doi.org/10.1016/j.onehlt.2024.100851. Acesso em:10/10/2024.

THIELEN, B. K. *et al.* Case Report: Locally Acquired Leptospirosis in a Minnesota Boy and His Dog. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 110, n. 1, p. 123-126, 2024. doi:10.4269/ajtmh.23-0291. Acesso em:10/10/2024.

VAN DE MAELE, I. *et al.* Leptospirosis in dogs: a review with emphasis on clinical aspects. **Veterinary Record**, v. 163, n. 14, p. 409-413, 2008. doi:10.1136/vr.163.14.409. Acesso em:23/06/2023.

WEIS, S. *et al.* Detection of Leptospira DNA in urine and presence of specific antibodies in outdoor cats in Germany. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 19, n. 4, p. 470-476, 2016. doi:10.1177/1098612X16634389. Acesso em:20/08/2023.

YAAFAR *et al.* (2019). Possible clinical leptospirosis in two cats (*Felis silvestris catus*) from the south of the Santa Fe province. **Ciencia Veterinaria**, 21(2), 85–98. <https://doi.org/10.19137/cienvet-201921206>. Acesso em:02/05/2023.