UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA LEPTOSPIROSE FELINA

Nathalia Cristina Morais
Médica Veterinária

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA LEPTOSPIROSE FELINA

Discente: Nathalia Cristina Morais
Orientadora: Profa. Dra. Adolorata Aparecida Bianco Carvalho

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, área Medicina Veterinária Preventiva

2020

M827c

Morais, Nathalia Cristina
Caracterização epidemiológica da leptospirose felina / Nathalia Cristina Morais. -- Jaboticabal, 2022
41 f.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Adolorata Aparecida Bianco Carvalho

1. Epidemiologia. 2. Felinos domésticos. 3. Fonte de infecção. 4. Leptospirose. 5. Saúde Pública. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA LEPTOSPIROSE FELINA

AUTORA: NATHALIA CRISTINA MORAIS

ORIENTADORA: ADOLORATA APARECIDA BIANCO CARVALHO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Medicina Veterinária Preventiva pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ADOLORATA APARECIDA BIANCO CARVALHO (Participaçao Virtual)
Depto. de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

p/ Profa.Dra. CARLA RESENDE BASTOS (Participaçao Virtual)
Centro Universitário Uningá / Maringá/PR

p/ Profa. Dra. KARINA PAES BÜRGER (Participaçao Virtual)
Depto. de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 19 de janeiro de 2021

Dados Curriculares do Autor

Nathalia Cristina Morais, Bom Repouso, 06/12/1991 – Filha de Adilson de Morais e Izabel Cristina Domingues de Morais, nascida em 06 de dezembro de 1991, no município de Pouso Alegre/MG. Ingressou em agosto de 2010 no curso de Medicina Veterinária na Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC MINAS), Câmpus de Poços de Caldas, na condição de bolsista integral do Programa Universidade para Todos (PROUNI), concluindo em dezembro de 2015. No decorrer da graduação realizou monitorias nas disciplinas de Anatomia dos Animais Domésticos I e II, Diagnóstico por Imagem e Clínica Médica de Pequenos Animais. Foi membro fundador do Grupo de Estudos em Pequenos Animais, no ano de 2012. Realizou estágio extracurricular na Clínica Pronto Socorro Veterinário de Poços de Caldas/MG, no Centro Veterinário da PUC-MINAS Câmpus de Poços de Caldas e no Hospital Veterinário da FCAV/Unesp Câmpus de Jaboticabal. Cumpriu o estágio obrigatório curricular no Hospital Veterinário da FCAV/Unesp Câmpus de Jaboticabal, nas áreas de Cardiologia Veterinária e Clínica Médica de Pequenos Animais, sob a orientação do Prof. Dr. Aparecido Antônio Camacho e da Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa, respectivamente. Ingressou em 2016 no Programa de Residência em Área Profissional da Saúde – Medicina Veterinária e Saúde, subárea Medicina Veterinária Preventiva, voltando sua formação para atuação em doenças infectocantagiosas de pequenos animais e zoonoses. Realizou curso de Aprimoramento em Clínica Médica de Pequenos Animais pela CAPESVET, em Ribeirão Preto/SP. Iniciou curso de Pós-Graduação Stricto Senso, em julho de 2018, voltado para a pesquisa em Leptospirose Felina.

"Descobrir consiste em olhar para o que todo mundo está vendo e pensar uma coisa diferente"

Roger Von Oech

Dedico

À minha família, em especial aos meus pais, Adilson de Morais e Izabel Cristina Domingues de Morais. Aos meus "filhos de quatros patas" Bob, Bela, Mel, Jojo, Lulu, Lua e Charlote. Agradeço o apoio, preocupação e amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade e, por estar comigo em todos os dias.

Aos meus pais, Adilson de Morais e Izabel Cristina Domingues Morais, obrigada pelo apoio, pelo amor e cuidado diário.

Aos meus cães, Bob, Bela e Mel, eu agradeço o amor incondicional mesmo que tão distantes. Obrigada por tudo e tanto.

Aos meus gatos, Jojô, Lua, Lulu e Charlote, vocês chegaram em minha vida de uma forma surpreendente e aqui se fizeram amor.

Aos meus familiares, obrigada por serem a melhor família que eu poderia ter. Vocês fazem parte dessa nova conquista.

À minha orientadora, Profa. Dra. Adolorata Aparecida Bianco Carvalho, novamente, agradeço a oportunidade e confiança.

A Cirlene e a todos do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário, pelo apoio e disponibilidade durante a execução desse trabalho.

A todos do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, que foram essenciais para a concretização deste estudo.

À minha querida mãe adotiva, Márcia Regina Dacal Seguim Amâncio, que sempre esteve comigo, desde o início me acolheu como uma filha. Agradeço a Deus por ter te colocado em minha vida.

À minha querida amiga Jaislane Braz, que nunca poupou esforços para estar ao meu lado, você sempre estará em meu coração.

À minha querida amiga, co-orientadora, Carla Resende Bastos, obrigada por tantos ensinamentos, pela paciência, amizade e por compartilhar comigo esse sonho.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Universidade Estadual Paulista – FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal/SP, que abriu suas portas e se tornou minha segunda casa.

Enfim, estendo os meus agradecimentos e minha gratidão a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desta etapa.

SUMÁRIO

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS ix
LISTA DE ABREVIATURAS..... x
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS 1
Resumo 1
Introdução 1
Agente etiológico 3
Epidemiologia 4
Patogenia 6
Diagnóstico 7
Tratamento 8
Prevenção 9
Referências 10
CAPÍTULO 2 - CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA LEPTOSPIROSE FELINA 12
RESUMO 12
INTRODUÇÃO 14
MATERIAL E MÉTODOS 15
Tamanho da Amostra 15
Felinos domésticos 15
Técnica de Soroaglutinação Microscópica (MAT) 16
Extração de DNA 17
Reações PCR 18
RESULTADOS 19
Soroprevalência 19
Tabela 1- Sorogrupo, Sorovar e frequência de títulos na Técnica de Soroaglutinação Microscópica (MAT) 19
DISCUSSÃO 20
CONCLUSÃO 25
CONFLITO DE INTERESSE 26
FINANCIAMENTO 26
REFERÊNCIAS 27
CONSIDERAÇÕES FINAIS 30

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **"Caracterização molecular, soroepidemiológica e geoespacial de *Leptospira* spp. em felinos domésticos de Jaboticabal e região no Estado de São Paulo"**, protocolo nº 015747/2018, sob a responsabilidade da Profª Drª Adolorata Aparecida Bianco Carvalho, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado "*Ad referendum*" pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP.

Vigência do Projeto	01/01/2019 a 31/08/2020
Espécie / Linhagem	Felinos domésticos
Nº de animais	138
Peso / Idade	Variado
Sexo	Variado
Origem	Atendidos no Hospital Veterinário "Governador Laudo NAtel" (HV), Unidade Auxiliar da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), UNESP, Câmpus de Jaboticabal

Jaboticabal, 12 de dezembro de 2018.

Prof. Dr. EVERLON CID RIGOBELO
Vice-Coordenador – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal/ SP - Brasil
tel 16 3209 7100 www.fcav.unesp.br

LISTA DE ABREVIATURAS

CEUA: Comissão de Ética no uso de Animais

DMVPRA: Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

ELISA: Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

EMJH: Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris

FCAV: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias

LPS: Lipopolissacarídeos

MAT: Técnica Soroaglutinação Microscópica

NaCL: Cloreto de Sódio

OIE: Organização Mundial da Saúde Animal

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PROUNI: Programa Universidade para Todos

PUC: Pontifícia Universidade Católica

PVP: Polivinilpirrolidona

rRNA: RNA ribossômico

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

SRD: Sem raça definida

SP: São Paulo

Unesp: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

LEPTOSPIRA SPP. EM GATOS: UMA VISÃO MULTIDISCIPLINAR

RESUMO

Relevância: A leptospirose é uma doença bacteriana, emergente, considerada como a zoonose mais difundida pelo mundo, visto que já foi observada em mais de 150 espécies de mamíferos, incluindo animais domésticos e silvestres, além dos humanos, bem como em espécies de aves, anfíbios, répteis e peixes. Essa variedade de hospedeiros e a capacidade de evasão do sistema imunológico garantem a permanência e perpetuação do agente, resultando em um importante problema para a Saúde Animal e a Saúde Pública.

Infecção nos gatos: Nos felídeos, os relatos de leptospirose são incomuns. Entretanto, a espécie vem se destacando devido às constatações de eliminação urinária do agente e, consequentemente, surge como potencial fonte de infecção. Além de serem suscetíveis a infecção, os gatos também já demonstraram serem capazes de desenvolver imunidade específica, mediante a produção de anticorpos. Ainda, ressalta-se que o fato de a maior parte dos gatos serem portadores sãos potencializa as chances de transmissão. Deveras, pouco se conhece sobre o comportamento do agente nessa espécie, mas acredita-se ser semelhante ao que acontece em cães e humanos. Nos gatos, a infecção vem sendo associada ao estilo de vida em que, animais de vida livre ou semidomiciliados que se alimentam de presa e caça, especialmente de roedores e pequenos mamíferos silvestres, apresentam maiores chances de exposição.

Relevância: Até o momento, a apresentação clínica de leptospirose felina demonstrou ser incomum. Apesar disso, ainda pouco se sabe sobre o real papel das leptospiras como patógenos para os gatos, além da função desses como portadores e possíveis fonte de infecção. Mas, acredita-se que o papel desses animais na cadeia epidemiológica de transmissão do agente esteja sendo subestimado. Dessa forma, tem-se como objetivo realizar uma revisão de literatura sobre a infecção de *Leptospira spp*. em gatos e desmitificar alguns conceitos.

Palavras-chave: epidemiologia; felinos domésticos; fonte de infecção; leptospirose; Saúde Pública.

INTRODUÇÃO

Atualmente, as doenças de origem infectocontagiosa vêm se destacando e isso se deve ao fato de que os agentes infecciosos cruzam o mundo de forma rápida e dinâmica, além de apresentar mecanismos de evasão do sistema imunológico; tudo isso favorece a exposição de humanos e animais a constantes riscos de infecção e doença (PAPPAS et al.,2008). Em paralelo, observa-se um crescente número de cães e gatos nos domicílios e uma mudança na forma como esses *pets* estão inseridos nas famílias, sendo considerados como membros delas. Todavia, essa configuração de família multiespécie e o estreitamento da relação humano-animal, traz consigo a necessidade de ampliação do conhecimento, especialmente no âmbito das doenças potencialmente zoonóticas (RIBEIRO et al., 2018).

Nesse cenário, salienta-se a importância das *Leptospiras spp.* que são responsáveis pela leptospirose, doença zoonótica considerada emergente e amplamente difundida pelo mundo, que acomete diversas espécies animais, entre mamíferos, aves, anfíbios e répteis. Essa ampla variedade de hospedeiros suscetíveis e os mecanismos de escape imunológico ainda desconhecidos permitem a permanência e perpetuação do agente no ambiente, ao mesmo tempo em que resulta em diferentes variações regionais, dentro da cadeia epidemiológica (PICARDEAU, 2017).

Particularmente, nos grandes centros urbanos a leptospirose humana ainda é responsável por um número elevado de infecções que podem resultar em quadros desde assintomáticos até casos fatais (PICARDEAU, 2017). Nesse ambiente, um conjunto de fatores estão envolvidos na disseminação do agente; contudo, acredita-se que a expansão dos roedores sinantrópicos seja o principal fator responsável pela transmissão urbana da leptospirose, visto que, já foi demonstrado que esses roedores podem albergar diferentes espécies do gênero Leptospira em seus túbulos renais eliminá-los pela urina (DUPOUEY et al., 2014).

Assim como os humanos, cães e gatos também são constantemente expostos ao risco de infecção leptospírica. Apesar da literatura indicar que os felinos são menos suscetíveis quando comparado aos caninos, recentemente, diversos estudos vêm demonstrando que a espécie parece estar mais envolvida

na cadeia epidemiológica de transmissão do agente do que se imaginava anteriormente. Mesmo assim, os estudos acerca da leptospirose em felinos ainda são escassos e pouco elucidativos, resultando em muitas divergências no âmbito do real significado da infecção e da doença para a espécie (MURILLO et a., 2020).

Portanto, considerando a importância zoonótica do agente e os diferentes questionamentos que pairam a respeito da ligação entre a leptospirose e os felinos domésticos, idealizou-se uma revisão de literatura sobre o tema a fim de esclarecer o papel que os felinos podem desempenhar na epidemiologia da leptospirose e sua relevância no contexto da Saúde Pública. Ainda, objetivou-se elucidar a importância desse agente como patógeno para a espécie.

AGENTE ETIOLÓGICO

As leptospiras são espiroquetas que pertencem à ordem Spirochaetales, família Leptospiraceae, e gênero *Leptospira,* que inicialmente foi dividido em duas espécies, a *Leptospira interrogans*, com sorovares patogênicos, e a *Leptospira biflexa*, contendo as sorovares não patogênicos, também conhecidos como saprófitas. Com o advento das técnicas moleculares, essa caracterização fenotípica foi substituída por uma nova classificação, a genotípica, baseada em análises filogenéticas do gene 16rRNA, a qual separou as espécies do gênero em três grupos: das patogênicas, das intermediárias e das saprófitas (AZÓCAR-AEDO; SMITS; MONTI, 2014).

Por sua vez, as diferentes espécies do gênero Leptospira se distribuem em cerca de 26 sorogrupos e em mais de 260 sorovares (MURILLO et al., 2020). Essa distribuição, baseada na expressão do LPS da membrana externa, determina a diversidade antigênica entre os sorovares e os congrega em sorogrupos que compartilham características semelhantes (ADLER; MOCTEZUMA, 2010). Entretanto, apesar dessa distribuição, já foi verificado que sorovares de um mesmo sorogrupo, porém pertencentes a diferentes regiões geográficas, podem apresentar composição genética, patogenicidade e hospedeiros distintos, fato que contribui para a manutenção no ambiente (GREENE et al., 2015).

Além de sua classificação distinta, as leptospiras são microrganismos peculiares, pois apresentam aspectos morfológicos singulares. Elas são bactérias filamentosas, finas e flexíveis, que formam espirais com extremidade em forma de gancho. Constituem-se de um corpo cilindro citoplasmático (protoplasmático), envolvendo um filamento axial central retilíneo, composto de dois flagelos periplasmáticos, que são inseridos em locais subterminais da espiroqueta. Essas estruturas são envoltas por um envelope ou membrana (BHARTI et al.,2003; GREENE et al.,2015). Além dessa organização, outra particularidade desse agente é apresentar características que são comuns tanto entre bactérias gram negativas, como gram positivas. Tal complexidade morfológica, juntamente com outros fatores, garante a manutenção e a distribuição pelo mundo (BHARTI et al., 2003).

EPIDEMIOLOGIA

As leptospiras são amplamente difundidas pelo mundo. Inicialmente, acreditava-se que apenas os mamíferos fossem susceptíveis; contudo, com a expansão de pesquisas, foi observado que espécies de anfíbios, répteis e peixes também podem ser infectados (PICARDEAU, 2017). Usualmente, a leptospirose apresenta-se como uma doença endêmica em grande parte dos países, com aumentos sazonais na incidência em regiões tropicais (GREENE et al., 2015), uma vez que o solo úmido possibilita a sobrevivência das leptospiras por longos meses, favorecendo a contaminação ambiental (MURILLO et al., 2020).

No ambiente, as leptospiras são mantidas entre os numerosos hospedeiros de manutenção/reservatórios e, ainda, pelos incidentais. Nesses, a transmissão pode ocorrer tanto pelo contato direto, como indireto. A transmissão que ocorre entre os hospedeiros de forma direta está relacionada com o contato com urina, vias venéreas, mordidas e ingestão de tecidos/órgãos infectados. Sabe-se que as leptospiras colonizam os túbulos renais dos hospedeiros e são eliminadas junto com a urina desses animais, de forma contínua ou intermitente, podendo perdurar por até longos meses; a transmissão indireta, que ocorre por meio da exposição de animais susceptíveis a ambientes contaminados, como água e solo, é a forma mais comumente relatada de transmissão em cães e humanos (AZÓCAR-AEDO; SMITS; MONTI, 2014).

Ao contrário do que ocorre com cães e humanos, a transmissão indireta é pouco relatada nos felinos domésticos, visto que, a espécie apresenta uma aversão natural à água, o que torna esse tipo de transmissão menos provável na espécie. Entretanto, o hábito de caça dos gatos faz com que a transmissão direta, através da ingestão de presas infectadas, seja mais comum; salienta-se que essa transmissão entre presa/caça-predador/caçador é potencializada, pois muitos desses animais são considerados reservatórios naturais, a exemplo dos roedores (HARTMANN et al., 2013; MURILLO et al., 2020).

Embora exista uma diferença significativa entre as regiões geográficas, estudos baseados na técnica de soroaglutinação microscópica demonstraram uma soroprevalência em gatos que variou de 4% a 33,3% de positividade; e, verificou-se que os principais sorovares envolvidos foram os pertencentes aos sorogrupos Australis, Autumnalis, Ballum, Canicola, Gryppotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Pomona e Sejroe. Nesses estudos, não foi observada associação entre animais reagentes e sexo ou raça, porém foi verificado que animais mais velhos tinham maior predisposição em apresentar títulos. Além disso, gatos que viviam ao ar livre, ou que tinham acesso à rua, ou ainda que tinham um coabitante com acesso ao ambiente externo, eram mais propensos a exibir anticorpos, visto que, estavam expostos ao contato com os reservatórios (HARTMANN et al., 2013; SCHULLER et al., 2015; MURILLO et al., 2020).

Assim como a infecção já foi comprovada na espécie felina, vários estudos por PCR, que investigam o transporte renal de espécies de *Leptospira spp*., já confirmaram a presença de leptospiras na urina dos gatos. E, apesar dos estudos ainda serem restritos, demonstram uma prevalência que varia de 0% a 67,8%, firmando que o papel dos felinos como fonte de contaminação vem sendo subestimado, uma vez que a eliminação urinária de espécies de leptospiras os coloca como hospedeiros reservatórios crônicos e, portanto, potencial risco para outros animais e para a infecção humana (MURILLO et al., 2020).

PATOGENIA

Diversas síndromes podem ser observadas nos animais infectados. Essa variedade nos sinais clínicos é resultante de um conjunto de fatores, especialmente o tipo do inóculo, a virulência e a quantidade de microrganismos, além da imunidade do hospedeiro, ou seja, de sua capacidade em desenvolver

resposta imune imediata e eficaz (FAINE et al.,1999). Assim, pode-se observar desde quadros assintomáticos até formas agudas e fulminantes (PICARDEAU, 2017).

No caso dos felinos domésticos, os sintomas específicos de doença são pouco relatados. Mas, apesar de pouco conhecida, acredita-se que a patogenia da doença seja semelhante à caracterizada em cães e em humanos (MURILLO et al., 2020). Nesses, a infecção se dá pelo contato direto com um hospedeiro, ou de forma indireta, por meio de água ou solo contaminados com urina de animais infectados. Logo após a penetração pelas membranas mucosas, pele íntegra úmida ou escoriada, as leptospiras ganham a corrente sanguínea e se multiplicam rapidamente em um período de bacteremia que dura cerca de sete dias (HARTMANN et al., 2013; MURILLO et al., 2020). É nesse período que as leptospiras atingem níveis consideráveis e, então, tem-se o início dos sinais clínicos, que refletem os danos nos órgãos causados pela ação das toxinas bacterianas e dos componentes celulares tóxicos e, ainda, por ação de citocinas induzidas pelas leptospiras e por invasão direta de células inflamatórias (MURILLO et al., 2020).

Inicialmente, a lesão vascular se desenvolve em pequenos vasos sanguíneos, culminando em pontos de isquemia em órgãos, que por sua vez, resultam em necrose de túbulo renal (nefrite), lesões hepatocelular e pulmonar, meningite, miosite e placentite (ADLER, MOCTEZUMA, 2010), além dos distúrbios coagulativos (GREENE et al., 2015). A nefrite observada nesses animais é potencializada com a colonização renal, que ocorre na maioria dos animais infectados, pois a multiplicação e a persistência desses microrganismos nos túbulos renais instiga a liberação de citocinas e o recrutamento de células inflamatórias que acentua a nefrite (MURILLO et al., 2020).

Com a elevação dos anticorpos específicos, que inicia a partir do sétimo dia de infecção, ocorre a eliminação das leptospiras da corrente sanguínea e de quase todos os órgãos. Contudo, como mecanismo de escape, os microrganismos se instalam em órgãos como os rins, cérebro, olhos e trato genital. Nos rins, especificamente nos túbulos renais, as leptospiras encontram um ambiente favorável e, então, se instalam e continuam a sua replicação; Agora, elas são eliminadas junto com a urina durante um período variado de dias

até meses; esse período, assim como, a intensidade de eliminação pode variar de acordo com a espécie de hospedeiro e o sorovar infectante (SCHULLER et al., 2015; MURILLO et al., 2020).

Nesse momento, os animais tornam-se portadores renais, e são considerados o ponto chave da epidemiologia da leptospirose (FAINE et al.,1999). Anteriormente, essa hipótese não era considerada para os felinos, porém com o advento de novas técnicas de diagnóstico e a expansão dos estudos, demonstrou-se que os gatos podem atuar como hospedeiros portadores, mesmo sem o desenvolvimento de doença clínica (HARTMANN et al., 2013; MURILLO et al., 2020).

DIAGNÓSTICO

O diagnóstico de leptospirose animal pode ser realizado mediante a utilização de métodos diretos e indiretos de identificação; todavia, testes como cultura bacteriana a partir de amostras de urina, sangue e tecidos não são utilizados na rotina clínica por demandar até seis meses de cultivo, porém é essencial para o reconhecimento da epidemiologia local (HARTMANN et al., 2013; MURILLO et al., 2020). Assim, os testes usualmente recomendados para o diagnóstico de infecção em medicina veterinária compreendem a Técnica de Soroaglutinação Microscópica (MAT) e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (BRASIL,1995; GREENE et al., 2015).

Os métodos indiretos baseiam-se na observação de anticorpos específicos que são produzidos pelo sistema imune durante a fase de leptospiremia. Esses anticorpos podem ser identificados utilizando-se o Teste de Soroaglutinação Microscópica (MAT) e/ou o ensaio de Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA). O MAT é o método recomendado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE,2014) para o diagnóstico em animais de produção, cães e em humanos e, apesar de ainda não ser padronizado para a espécie felina, vem sendo utilizado com sucesso em diversos países (HARTMANN et al., 2013). Embora seja o método de escolha, algumas limitações podem dificultar o diagnóstico preciso, uma vez que podem ser observadas reações cruzadas que dificultam a identificação do sorovar infectante; outro inconveniente é a variação de resposta imunológica. que pode

variar de acordo com o hospedeiro, além do período decorrido para a produção dos anticorpos, que se dá a partir do sétimo dia de infecção (ADLER; MOCTEZUMA, 2010; HARTMANN et al., 2013).

Nos felinos domésticos, algumas informações referentes a duração dos anticorpos no sangue, período decorrido para a soroconversão, assim como sorovares envolvidos e significado dos títulos expressos, ainda são fonte de estudo. Apesar dessas limitações, acredita-se que, pelo fato de os felinos não serem vacinados contra espécies de *Leptospira spp*., o diagnóstico seja favorecido, já que não há produção de anticorpos vacinais; assim, os anticorpos encontrados nessa espécie são resultantes de exposição natural (HARTMANN et al.,2013; MURILLO et al., 2020).

Diferentes métodos podem ser adotados para a identificação direta das leptospiras, incluindo a visualização em urina fresca por microscopia de campo escuro, cultura de tecidos e urina, ou detecção do material genético pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Entretanto, os resultados desses métodos sempre devem ser interpretados com cautela, visto que, a eliminação desse agente pela urina ocorre de forma intermitente e, muitas vezes, em número baixo, o que pode prejudicar o diagnóstico; assim, resultados negativos não devem excluir a possibilidade de infecção (HARTMANN et al., 2013).

Posto isso, apesar dos testes serem capazes de detectar indícios de infecção em fases distintas, é recomendada a associação entre métodos diretos e indiretos com o objetivo de aumentar a sensibilidade do diagnóstico (KOSITANONT et al., 2007; GREENE et al., 2015).

TRATAMENTO

Assim como nos cães, o tratamento dos felinos com leptospirose consiste em terapia suporte e antibióticos. A gravidade dos sinais clínicos e a presença ou não de disfunção renal e/ou hepática, além de outros complicadores, ditam a terapia suporte e o protocolo antimicrobiano a serem utilizados (HARTMANN et al., 2013). Para a estabilização inicial do paciente, muitas vezes é necessário o uso de fluidoterapia para corrigir os possíveis distúrbios hidroeletrolíticos; o uso de antieméticos e protetores gástricos também é recomendado, especialmente quando há relatos de insuficiência renal associada. Nesses casos, também se faz uso de diuréticos para auxiliar na lesão renal. Em alguns casos, transfusão

de sangue, uso de tubos de alimentação enteral e até hemodiálise, são necessários (GREENE et al., 2015; SCHULLER et al., 2015; MURILLO et al., 2020).

A antibioticoterapia é parte essencial do tratamento e deve ser instituída assim que se tem a suspeita de infecção, pois ela inibe rapidamente a multiplicação das leptospiras e, consequentemente, cessam as lesões que são resultantes dessa (GREENE et al., 2015). A escolha dos antibióticos nos felinos segue as recomendações para os cães; assim, no primeiro momento, para inibição da multiplicação bacteriana, a penicilina e seus derivados, como a ampicilina e amoxicilina, são de escolha. Em um segundo momento, para eliminar o estado de portador renal, a doxiciclina é empregada (HARTMANN et al., 2013; MURILLO et al., 2020).

PREVENÇÃO

Até o presente momento, comercialmente, não há nenhuma vacina disponível para felinos. Embora existam registros de que esses animais possam responder imunologicamente a vacinas utilizadas em cães, ainda são necessários estudos que firmem essa hipótese. Dessa forma, a melhor forma de prevenção é evitar a exposição ao agente, por meio da domesticação, mantendo os animais dentro de casa, uma vez que isso diminui o risco de exposição; restringir o acesso a possíveis fontes de água ou solo contaminados, além de limitar os hábitos de predação de presas fontes de infecção. Ressalta-se que essas recomendações devem ser validas para todos os membros que coabitam o mesmo ambiente.

REFERÊNCIAS

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

AZÓCAR ÁEDO, L.; SMITS, H.L.; MONTI, G. Leptospirosis in dogs and cats: epidemiology, clinical disease, zoonotic implications and prevention. **Archivos de Medicina Veterinária**, v. 46, p.337 – 348, 2014.

BHARTI, A.R.; NALLY, J.E.; RICALDI, J.N.; MATTHIAS, M.A.; DIAZ, M.M.; LOVETT, M.A.; LEVETT, P.N.; GILMAN, R.H; WILLIG, M.R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J.M. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **THE LANCET: Infectious Diseases**, v.3, p. 757 – 771, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de leptospirose. Brasília, p.98, 1995.

DUPOUEY, J.; FAUCHER, B.; EDOUARD, S.; RICHET, H.; KOJO, A.; DRANCOURT, M.; DAVOUST, B. Human leptospirosis: na emrging risk in Europe? **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Disease,** v. 37, n.1, p.77-83, 2014**.**

FAINE, S.; ADLER, B.; BOEIN, C.; PEROLAT, P. *Leptospira* and Leptospirosis. **Medisci Press**, Melbourne: Austrália, 2. ed., 1999.

GREENE, C.E.; SYKES, J.E.; MOORE, G.E.; GOLDSTEIN, R.E.; SCHULTZ, R.D. Leptospirose. In: GREENE, C.E. 4.ed**. Doenças Infecciosas em cães e gatos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 42, p. 454 – 471, 2015.

HARTMANN, K.; EGBERINK, H.; PENNISI, M.G.; LLORET, A.; ADDIE, D.; BELÁK, S.; BOUCRAUT-BARALON, C.; FRYMUS, T.; GRUFFYDD-JONES, T.; HOSIE, M.J.; LUTZ, H.; MARSILIO, F.; MÖSTL, K.; RADFORD, A.D.; THITY, E.; TRUYEN, U.; HORZINEK, M.C. Leptospira species infection in cats: ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 15, p. 576 – 581, 2013.

KOSITANONT, U.; RUGSASUK, S.; LEELAPORN, A.; PHULSUKSOMBATI, D. TANTITANAWAT, S.; NAIGOWIT, P. Detection and differentiation between pathogenic and saprophytic *Leptospira* spp. by multiplex polymerase chain reaction. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 57, n. 2, p. 117-122, 2007.

MURILLO, A.; GORIS, M.; AHMED, A.; CUENCA, R.; PASTOR, J. Leptospirosis in cats. Current literature review to guide diagnosis and management, **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.22, p.216-228, 2020.

OIE. World Organisation for Animal Health. **Listed Diseases, Infections and Infestations in Force in 2014**. Disponível em: <http://www.oie.int/animal-**health-in-the-world/oie-listed-diseases-2014>. Acesso em: 15 de setembro de** 2020.

PAPPAS, G.; PAPADIMITRIOU, P.; SIOZOPOULOU, V.; CHRISTOU, L.; AKRITIDIS, N. The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. **International Journal of Infectious Diseases**, v.12, p.351-357, 2008.

RIBEIRO, T.M.P.; SANTOS, H.D.; SOUSA, S.A.P.; GALVÃO, S.R.; REIS, T.S.; JAYME, V.S**.** Infecção por Leptospira spp. em gatos (Felis silvestris catus). Uma Revisão**. Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal,** v.12, p. 101-119, 2018.

SCHULLER, S.; FRANCEY, T.; HARTMANN, K.; HUGONNARD, M.; KOHN, B.; NALLY, J.E.; SYKES, J. European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats. **Journal of Small Animal Practite**, v. 56, p. 159 – 179, 2015.

CAPÍTULO 2: CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA LEPTOSPIROSE FELINA

RESUMO

Objetivos: A leptospirose felina é considerada rara; contudo, sinais clínicos associados à lesão renal foram relatados. Ainda, foi demonstrado que, após exposição ao agente, há desenvolvimento de anticorpos específicos e, em estudos recentes, na Alemanha, Canadá e Espanha, foi descrita a eliminação de DNA leptospiral pela urina. Assim, o objetivo deste estudo foi demonstrar a presença de anticorpos contra espécies de *Leptospira spp.*, os sorogrupos e sorovares envolvidos, além de investigar a presença de DNA leptospiral na urina e no sangue de felinos domésticos atendidos no Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel", Câmpus de Jaboticabal, Unesp.

Métodos: Foram avaliados 138 felinos domésticos domiciliados e semi-domiciliados. As amostras de sangue total e urina foram testadas por PCR, visando os genes 16S e LipL32. Os anticorpos foram avaliados com o uso da técnica de soroaglutinação microscópica (MAT), utilizando 36 sorovares, contendo estirpes padrões e autóctones.

Resultados: Das de 138 amostras de soro analisados pelo MAT, 5 (3,6%; IC 95%: 1,55 – 8,20) foram reagentes para sorovares de *Leptospira spp*. Os sorovares observados foram Copenhageni (estirpe LO10), Pyrogenes e Castellonis, e os títulos de anticorpos variaram de 100 a 200. Não foi observada amplificação de DNA leptospiral nas amostras analisadas.

Conclusões e relevância: Os felinos domésticos do referido estudo apresentaram soropositividade contra sorovares pertencentes aos sorogrupos

Icterohaemorrhagiae, Pyrogeneses e Ballum. A presença de imunoglobulinas pelo teste sorológico denota exposição natural ao agente, uma vez que os animais não eram vacinados, fato que ocorre nos cães. Apesar disso, no momento da análise molecular, não foi observada bacteremia e eliminação urinária do agente; contudo, ressalta-se que, nos gatos, o período de bacteremia é curto e a eliminação pela urina é intermitente. Dessa forma, estudos mais abrangentes e com maior período de acompanhamento dos animais são necessários para compreender o papel da espécie na cadeia epidemiologia da doença.

INTRODUÇÃO

A Leptospirose é uma doença de caráter zoonótico, cosmopolita, causada por espécies do gênero *Leptospira*, já relatado em mais de 150 espécies de mamíferos[1,2]. Essa ampla variedade de hospedeiros contribui para a manutenção do agente no ambiente[3], além de destacar a importância da doença no contexto de Saúde Única[1,4]. Embora a doença seja bem definida em algumas espécies animais, ainda é fruto de controvérsias nos felídeos[2]. Historicamente, os felídeos foram tidos como refratários à infecção por *Leptospiras*, especialmente pelo fato de serem predadores dos principais reservatórios do agente, o que resultaria em imunidade natural[5]. Entretanto, estudos vêm questionando essa hipótese. Pesquisas de inoculação experimental comprovaram que, após a exposição ao agente, há produção de anticorpos específicos[6,7]; além disso, foi verificado afinidade das *Leptospiras* pelos túbulos renais, resultando em sinais clínicos compatíveis com lesão renal e leptospirúria, que foi verificada por até três meses na espécie[6].

Esses fatores, juntamente com o crescente número de felinos domésticos como animais de companhia, suscita a preocupação do papel desses animais na transmissão de agentes infecciosos para humanos e coabitantes. Assim, o objetivo do presente estudo foi demonstrar a presença de anticorpos contra espécies patogênicas de *Leptospira spp.*, os sorogrupos e sorovares envolvidos, além de investigar a presença de DNA leptospiral na urina e no sangue de felinos domésticos atendidos no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, Câmpus de Jaboticabal, Unesp.

MATERIAL E MÉTODOS

Tamanho da amostra

O tamanho da amostragem de sangue total e soro a ser analisada foi determinado segundo a fórmula de Thrusfield[8]: N= p X q X z^2/d^2, sendo N o número de amostras, P a prevalência esperada (adotado 10%), Q sendo 100-p, Z, o escore padrão (1,96 para intervalo de confiança de 95%) e D, o erro admitido (adotado 5). De acordo com a fórmula, 138 amostras deveriam ser analisadas. Em virtude da dificuldade em obtenção das amostras de urina, a amostragem foi obtida sempre que possível.

Felinos domésticos

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp - Câmpus de Jaboticabal/SP (protocolo nº 015747/2018). As amostras do estudo foram obtidas de felinos domésticos em parceria com as especialidades do Hospital Veterinário da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal, no período de março a julho de 2019. Foram incluídos felinos domésticos com ou sem sinais clínicos específicos de leptospirose.

Foram obtidas 22 amostras de urina, por cistocentese, com material descartável e sem a adição de tampão, as quais ficaram armazenadas em freezer de ultrabaixa temperatura (-80º C), até o processamento.

As amostras de sangue total foram colhidas por punção de veia jugular, seguindo os padrões do hospital veterinário. Dessas amostras, alíquotas de sangue total e de soro foram armazenadas em temperatura de -80ºC, até o momento de serem processadas.

Técnica de Soroaglutinação Microscópica (MAT)

Para pesquisa de anticorpos contra espécies patogênicas de *Leptospira spp.,* foi adotada a Técnica de Soroaglutinação Microscópica (MAT), teste preconizado pela OIE[9]. Foi empregado o acervo de antígenos do Laboratório de Leptospirose e Brucelose do DMVPRA da FCAV/Unesp Câmpus de Jaboticabal, oriundas de matrizes repicadas semanalmente em meio líquido de EMJH, tendo como inócuo 10% do volume do meio a semear, e mantidas em estufa bacteriológica a 28ºC. Salienta-se que os antígenos utilizados são puros, livres de autoaglutinação e isentos de contaminação.

O acervo utilizado contempla 36 sorovares (24 de referência: Andamana, Australis, Autumnalis, Bataviae, Bratislava, Butembo, Canicola, Castellonis, Copenhageni, Cynopteri, Grippotyphosa, Hardjo, Hebdomadis, Icterohemorrhagiae, Javanica, Panama, Patoc, Pomona, Pyrogenes, Shermani, Sentot, Tarassovi, Whitcombi e Wolffi; 12 estirpes autóctones, isoladas de animais no Brasil: 110/06, 2A–CAP, Brasiliensis, Guaricura, Goiano, LO10, LO04, LO14, UNESP 01, 02, 03 e 05).

Inicialmente, as amostras de soro eram diluídas 1:25 em solução salina 0,85% em tubos de hemólise. Dessa diluição, alíquotas de 25µL eram adicionadas em placas de poliestireno, acrescentando-se a mesma quantidade de antígeno, resultando na diluição 1:50. A mistura era levemente homogeneizada e incubada em estufa a temperatura de 28ºC por 40 minutos.

A leitura era feita em microscopia de campo escuro, considerando reagentes as amostras que atingiam 50% de aglutinação. A triagem era realizada a partir da diluição 1:50, posteriormente tituladas em razão dois (1:100 a 1:800). O *cut off* adotado foi o valor ≥ 100.

Extração de DNA

As extrações de DNA das amostras de sangue e de urina foram realizadas segundo metodologia proposta por Bag et al.[10], com modificações. Eram utilizados 250µL de sangue total de cada amostra e 750µL do tampão de extração de DNA, composto por 160mM de Tris-HCl pH 8.0, 60mM de EDTA pH 8.0, 20mM de NaCl, SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) 0,5%, PVP (Polivinilpirrolidona) 1%, β-mercaptoetanol 0,2% e ProteinaseK 10mg/mL. Para a extração de DNA de urina, primeiramente eram centrifugados 2000µL da amostra de urina a 10000xg por 25 minutos. Em seguida, 1750µL do sobrenadante eram pipetados e descartados. Ao precipitado de células acrescentavam-se 750µL do tampão de extração de DNA. Os tubos contendo as amostras e o tampão de extração de DNA eram vigorosamente agitados e a lise celular ocorria a 65°C por 50 minutos. Posteriormente, eram adicionados à solução 280µL de acetato de potássio 5M, a qual era misturada por inversão dos tubos e mantida no gelo por 30 minutos. Procedia-se a centrifugação a 13.000xg por 10 minutos, para precipitação dos restos de células e proteínas. A solução era, então, transferida para tubos novos e submetida a duas etapas de lavagens com 500µL de clorofórmio: álcool isoamílico 24:1 (v/v). Após as lavagens, ao sobrenadante translúcido transferido para tubos novos eram adicionados 1000µL de álcool etílico absoluto e a solução era misturada por inversão dos tubos e mantida a -20°C, por 12 horas. Após o período de precipitação do DNA, o *pellet* era obtido por centrifugação a 13.000xg por 18 minutos, lavado com solução de álcool etílico 70%, seco e suspendido em 25µL de solução TE 10:1 (10mM de Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0).

Reações de PCR (*Polimerase Chain Reaction*)

Para identificação da presença de *Leptospira spp*. nas amostras de sangue e de urina processadas, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores Lep1 (5'-GGC GGC GCG TCT TAA ACA TG-3') e Lep2 (5'-TTC CCC CCA TTG AGC AAG ATT-3') para amplificação de um fragmento de 331 pb da região ribossomal 16S[11]. Adicionalmente, também foram utilizados os oligonucleotídeos LipL32F (5'-ATC TCC GTT GCA CTC TTT GC-3') e LipL32R (5'-ACC ATC ATC ATC ATC GTC CA-3') para amplificação de um fragmento de 474 pb da região codificadora da lipoproteína LipL32[12]. Como controle positivo dessas reações, foi utilizado o DNA de uma cepa padrão de *Leptospira icterohaemorragiae*. Concomitantemente, as amostras também foram submetidas à reação para amplificação do gene GAPDH de mamíferos (5'-CCT TCA TTG ACC TCA ACT ACA T-3' e 5'-CCA AAG TTG TCA TGG ATG ACC-3')[13], visando aferir se as amostras que não apresentassem amplificação para Leptospira possuíam inibidores da PCR.

As reações de amplificação foram compostas por tampão 1X (KCl 50mM, TRIS-HCl 200mM, pH 8,4); 2mM de $MgCl_2$; 0,2mM de dNTP's; 0,5U de Taq DNA polimerase; 2,5pmol de cada primer; 2µL de DNA genômico total e água pura estéril para 20µL. As amplificações ocorreram em um termociclador Nexus (Eppendorf) programado para realizar um ciclo a 95ºC por 2 minutos e 30 segundos, 35 ciclos a 94ºC por 30 segundos, 56°C por 30 segundos, e 72ºC por 40 segundos, seguido de um ciclo final a 72ºC por 10 minutos. Os produtos de PCR foram submetidos à reamplificação utilizando os mesmos pares de oligonucleotídeos. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (5µg/mL) e visualizados em fotodocumentador BioRadXR.

RESULTADOS

Soroprevalência

Do total de 138 amostras de soro analisadas pelo MAT, 5 (3,6%; IC 95%: 1,55–8,20) foram reagentes. Os sorovares observados foram Copenhageni (estirpe LO10), Pyrogenes e Castellonis. Os títulos de anticorpos variaram de 100 a 200 (Tabela 1).

Dos animais positivos, 4 (80%) eram fêmeas e 1 (20%), macho. A idade dos reagentes variou de 1 a 17 anos (média de ≈ 10 anos); em relação à raça, todos os animais positivos eram sem raça definida (SRD).

Tabela 1. Sorogrupo, Sorovar e frequência de títulos de leptospiras, pela Técnica de Soroaglutinação Microscópica (MAT), obtidos a partir de amostras de soro de felinos. Jaboticabal/SP, 2021.

Sorogrupo	Sorovar	Títulos no MAT ≥ 1:100				Total
		1:100	1:200	1:400	1:800	
Ballum	Castellonis	1	0	0	0	1
Icterohemorrhagiae	LO10	2	0	0	0	2
Pyrogenes	Pyrogenes	1	1	0	0	2

Reações de PCR (*Polimerase Chain Reaction*)

Nas amostras de sangue total e urina analisada, não foram observadas amplificações para a presença de leptospira no momento da colheita. Ressalta-se que o GAPDH, funcionou indicando que o DNA não apresentava impeditivo de PCR.

DISCUSSÃO

O Brasil é um país considerado endêmico para leptospirose humana e animal, com picos de casos associados a períodos de maior pluviosidade e inundações, configurando uma doença de caráter sazonal[14]. A leptospirose é considerada uma importante enfermidade emergente e negligenciada, especialmente em países de clima tropical e subtropical, onde a associação com fatores de risco é comumente relatada[15,16]. Estima-se que, anualmente, o número de casos no mundo seja de 1 milhão e que os óbitos pela doença alcancem quase 60 mil casos no mundo[17]; no Brasil, em média, são registrados cerca de 3.926 casos humanos anualmente, com taxa de letalidade de 8,9%, consolidando a importância da doença no país[18].

Em geral, as leptospiras estão presentes em mamíferos domésticos e silvestres, distribuindo-se entre hospedeiros de manutenção e acidentais. Os hospedeiros de manutenção são responsáveis pela perpetuação do agente no meio e pela infecção em humanos. No ambiente urbano, os cães e os roedores sinantrópicos desempenham papel fundamental na transmissão da doença para humanos, sendo os roedores sinantrópicos fonte de infecção comum entre animais de companhia e humanos[22].

Estudos de inquérito sorológico e isolamento na espécie canina demonstraram que os cães são potenciais fonte de infecção para humanos, pois além de apresentar uma estreita relação, eles também podem atuar como portadores sãos, fatores que facilitam a transmissão[20]. Nesse contexto, expandir o conhecimento sobre as doenças potencialmente zoonóticas e as espécies envolvidas torna-se cada vez mais necessário. A dinâmica de transmissão das leptospiras é bem conhecida em algumas espécies, mas ainda é pouco

conhecida em outras, como nos felídeos, cuja participação na cadeia epidemiológica de transmissão é fruto de questionamentos [2,5,22].

Inicialmente, os felídeos foram tidos como refratários à infecção, por apresentar resistência natural frente ao agente, o que seria resultado de um processo evolutivo por serem predadores/caçadores de hospedeiros reservatórios. Contudo, essa teoria vem sendo colocada à prova, especialmente frente à mudança de habitat e manejo que a espécie vem sofrendo nas últimas décadas [2,5].

Embora o envolvimento dos felídeos na cadeia de transmissão da leptospirose ainda seja fruto de muito estudo, ao longo dos anos pesquisas já demonstraram diversas evidências que refutam a hipótese de resistência. Estudos baseados em infecção experimental, a partir da ingestão de roedores infectados ou de vísceras como rins e bexiga, verificaram que os felinos apresentam uma leptospiremia curta, resultado de uma rápida resposta imunológica; paralelamente, poucos sinais clínicos foram observados[6,7]. Todovia, sinais clínicos como poliúria, polidipsia, uveíte e claudicação, foram registrados[21]. Ainda, foi verificada a presença de leptospirúria por um período de até três meses[6]; portanto, é plausível dizer que felídeos sejam fonte de infecção, mesmo apresentando prevalência baixa e sinais clínicos brandos[7].

A leptospirose felina foi relatada pela primeira vez em 1972 e, desde então, inúmeros estudos de inquérito soroepidemiológico foram realizados[2]. Mundialmente, a prevalência sorológica varia de 4% a 33,3%[2]; no Brasil, a soropositividade relatada é de 0% a 22,6% [22]. Apesar de não estar inteiramente compreendido quais sorovares podem causar infecções acidentais e quais estariam envolvidos no desenvolvimento de adaptação, é sabido que, apesar

das amplas variações geográficas, os principais sorovares relatados pertencem aos sorogrupos Australis, Autumnalis, Canicola e Sejroe[2]. Ainda, foi observado que a infecção em felinos está associada à ingestão de presas infectadas; assim, felinos com acesso à rua têm maiores chances de se infectar por sorogrupos provenientes de hospedeiros reservatórios, especialmente os roedores sinantrópicos. No ambiente rural, a infecção se dá por contato indireto com urina de suínos e bovinos infectados[22,2]. Nesse cenário, pesquisas visando à observação da eliminação de espécies patogênicas de *Leptospira spp.* pela urina, utilizando a técnica de PCR, observaram uma ampla variação na prevalência, de 0% a 67,8%, de acordo com a localização geográfica e a técnica de identificação utilizada[2].

De acordo com os dados encontrados na literatura, pode-se observar que os resultados do presente estudo vão ao encontro dos relatados mundialmente. A prevalência de 3,6% de anticorpos anti-*Leptospira spp*. em felinos domésticos é um valor similar ao encontrado por Mosallanejad et al.[23], que avaliaram 102 amostras de gatos de vida livre e encontraram 5 (4,9%) positivos; por Markovich et al.[24], que analisaram 63 felinos domésticos e obtiveram uma positividade de 4,9%; e, recentemente, um estudo realizado na Espanha, com 244 gatos, demonstrou que 10 (4,1%) animais apresentaram anticorpos anti-*Leptospira spp*[25]. No Brasil, os estudos soroepidemiológicos ainda são escassos; contudo, Brasil et al.[3], analisando amostras de 129 gatos, obtiveram uma prevalência de 5,43%, e Santos et al.[26], que avaliando 43 gatos do semiárido do nordeste brasileiro, encontraram uma prevalência de 4,7%. Em contrapartida, alguns estudos não registraram positividade nos animais avaliados, a exemplo do trabalho realizado por Mittestainer et al.[27], que utilizaram

155 amostras de felinos domésticos dos municípios de Araçatuba-SP e Botucatu-SP, evidenciando as variações na prevalência que são resultantes das diferenças epidemiológicas locais[5], além do *cut off* e painel antigênico adotados na pesquisa[28].

Embora prevalências baixas sejam comumente relatadas, é possível observar pesquisas que demonstrem o contrário. Na Malásia, amostras de 110 gatos de quatro diferentes abrigos, sem histórico de sinais clínicos de leptospirose, foram analisadas utilizando o MAT, com 20 sorovares patogênicos de *Leptospira spp*., ponto de corte de ≥1:100, e 20 (18,18%) das amostras foram positivas[29]. Nesse cenário, na Alemanha, estudos com felinos domésticos com acesso livre à rua revelou a presença de anticorpos em 35/195 (17.9%) dos animais avaliados[30], novamente evidenciando as variações na prevalência que podem ser encontradas em diferentes regiões.

Nesse sentido, é possível observar uma ampla variedade de sorovares envolvidos[5]. Assim, Parreira et al.[31] no estudo com 330 gatos domésticos da região metropolitana de Goiânia, em Goiás, verificaram que os sorovares Cynopteri, Djasiman, Butembo e Castellonis foram os predominantes. Já, o estudo realizado no município de Patos, na Paraíba, que avaliou 129 gatos domésticos, entre domiciliados e errantes, observou que os animais foram reagentes apenas para o sorovar Pomona[3]. Outro estudo, realizado com animais selvagens e domésticos de duas áreas do semiárido do nordeste do Brasil, relatou que os sorovares predominantes nos felinos domésticos foram Andamana e Patoc[26]. Em nosso estudo, novamente pode-se ressaltar as diferenças regionais uma vez que os sorovares encontrados foram Copenhageni (estirpe LO10), Pyrogenes e Castellonis, os quais têm como principais

reservatórios os animais de produção e, especialmente, os roedores sinantrópicos..

Embora acredite-se que haja uma rápida resposta imunológica e, consequente, curto período de leptospiremia[6,7], os títulos de anticorpos na espécie felina são variáveis. Pesquisas realizadas em diversas regiões demonstraram uma variação de 100 a 12.800[32, 33, 30]; entretanto, títulos baixos são comumente relatados[33]. Além da hipótese que relata uma rápida resposta imunológica, presume-se que os baixos títulos de anticorpos seriam suficientes para controlar a infecção, justificando os baixos títulos de anticorpos anti-*Leptospira spp*. na espécie[33]. No presente estudo, obtiveram-see títulos de 100 a 200, similarmente ao encontrado por CORDEIRO, VIEIRA E OLIVEIRA[34], que observaram títulos de 200 a 400 em felinos domésticos da região metropolitana de Curitiba, no Paraná, e igualmente ao estudo de Garoussi et al.[35], em que o maior título obtido foi 200.

Pesquisas realizadas a partir de amostras de sangue são raras, contudo, Azizi et al.[36] observaram uma prevalência de 21,20% quando analisaram amostras de 132 gatos errantes. Recentemente, na Espanha, 89 amostras de sangue de felinos domésticos foram submetidas a PCR e apenas uma amostra foi positiva (1,12%), sem anticorpos detectados pelo MAT[25]. Em contrapartida, diversas pesquisas foram realizadas no intuito de verificar a eliminação via urinária de espécies patogênicas de *Leptospira spp.* Pelos felinos domésticos. Nessas pesquisas, foi observado que a prevalência varia de 0% a 67,8%, sem evidente associação com doença clínica[2]. No Canadá, um estudo realizado com felinos saudáveis e com doença renal, verificou DNA leptospiral na urina de dois dos125 felinos saudáveis testados e seis de 113 animais com doença renal,

totalizando uma prevalência de 3,33%[33]. Na Espanha, amostras de urina de quatro das 232 amostras analisadas amplificaram o DNA de espécies patogênicas de leptospira[25]. Até o momento, em Taiwan, foi observada a maior prevalência de eliminação urinária de espécies patogênicas de leptospira, 67,8% (80/118) das amostras[28]. Isso demonstra que os felinos domésticos podem atuar como hospedeiros portadores, mesmo sem desenvolver doença clínica evidente e anticorpos específicos, sugerindo que o papel da espécie na transmissão do agente deve ser reconsiderado[2].

No presente estudo, todas as amostras de sangue total e urina foram negativas para PCR de *L. interrogans*. Contudo, ressalta-se que as técnicas utilizadas visaram genes da espécie *L.interrogans* e, como visto no MAT, foi identificado um sorovar pertencente à espécie *L. borgptersenii*. Dessa forma, assim como nos cães com doença na forma assintomática, foi observado que, além de cepas de *L. interrogans*, outras espécies do gênero foram incriminadas na eliminação urinária e, embora novos estudos sejam necessários[19], é sabido que nos felídeos não se deve negligenciar o possível papel dessas leptospiras patogênicas, em particular por serem cada vez mais relatadas como responsáveis pelos casos graves em humanos[20].

CONCLUSÕES

Concluindo, este estudo descreve a soropositividade de felinos domésticos pelo MAT contra sorovares pertencentes aos sorogrupos Icterohaemorrhagiae, Pyrogeneses e, com destaque, para o Ballum que, diferentemente dos demais, pertence à espécie *Leptospira borgptersenii*, fato que simboliza a dinâmica de transmissão do agente. O conhecimento dos

sorogrupos envolvidos permite a realização precisa do diagnóstico, além do reconhecimento precoce, e posterior desenvolvimento de métodos preventivos, sinalizando aos médicos veterinários a necessidade de conscientização dos tutores dessa espécie animal. Na presente pesquisa, não foi observada a presença de DNA leptospiral nas amostras analisadas; todavia, esses resultados ressaltam a urgência de estudos mais amplos, com períodos de observação mais longos e que devem ser realizados para consolidar o papel dos felídeos na epidemiologia dessa zoonose, uma vez que, a bacteriemia é curta e a eliminação urinária é intermitente, fatores que podem interferir nos resultados.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos o apoio dos residentes e pós-graduandos do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, Câmpus de Jaboticabal, Unesp, durante a colheita das amostras.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não ter qualquer tipo de conflito de interesse.

FINANCIAMENTO

Os autores declaram que não receberam financiamento para execução da pesquisa.

REFERÊNCIAS

1. FAINE S, ADLER B, BOEIN C, et al. ***Leptospira*** **and Leptospirosis**. Medisci Press 1999; 2.

2. MURILLO A, GORIS M, AHMED A, et al. **Leptospirosis in cats. Current literature review to guide diagnosis and management.** Journal of Feline Medicine and Surgery 2020; 22: 216-228.

3. BRASIL AWL, PARANTONI RN, FEITOSA TF, et al. **Anticorpos anti-Leptospira spp. em gatos do semiárido do Estado da Paraíba**. Ciências Agrárias 2014; 35:3215 – 3220.

4. RODRIGUES CM. **One Health: subsídios para uma análise ampliada da leptospirose como uma zoonose negligenciada**. Revista Estácio Saúde 2015; 4:103 – 116.

5. SCHULLER S, FRANCEY T, HARTMANN K, et al. **European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats**. Journal of Small Animal Practite 2015; 56:159 – 179.

6. LARSSON CE, SANTA ROSA CA, LARSSON MH, et al. **Laboratory and clinical features of experimental feline leptospirosis**. Internacional Journal Zoonoses 1985;12: 111 – 119.

7. LANGONI H, CABRAL KG, KRONFLY CS. **Pesquisa de aglutininas anti-leptospiricas em gatos**. Clínica Veterinária 1998;3: 24 – 26.

8. THRUSFIELD M. **Veterinary Epidemiology.** Blackwell Science 2010; 3:610.

9. OIE. **Listed Diseases, Infections and Infestations in Force in 2014**. Disponível em: http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2014.

10. BAG S, SAHA B, MEHTA O, et al. **An improved method for high quality metagenomics DNA extraction from human and environmental samples.** Scientific Reports 2016; 6(26775):1-9.

11. MERIEN F, AMOURIAUX P, PEROLAT P, et al. **Polymerase Chain Reaction for Detection of Leptospira spp. in Clinical Samples**. Journal of Clinical Microbiology 1992; 2219-2224.

12. AHMED SN, MANJULATA D, VALVERDE MA, et al. **Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic Leptospira species**. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials 2006; 5:28.

13. BIRKENHEUER AJ, LEVY MG, BREITSCHWERDT EB. **Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of Babesia gibsoni (asian genotype) and B. canis DNA in canine blood samples**. Journal of Clinical Microbiology 2003; 41:4172– 4177.

14. HACKER KP, SACRAMENTO GA, CRUZ JS, et al. **Influência das chuvas na infecção e doença por *Leptospira* em ambiente urbano tropical, Brasil** 2020;26.

15. BHARTI AR, NALLY JE, RICALDI JN, et al. **Consórcio Peru-Estados Unidos de Leptospirose. Leptospirose: uma doença zoonótica de importância global.** Lancet Infection Diseases 2003;3:757 – 771.

16. HAGAN JE, MORAGA P, COSTA F, et al. **Spatiotemporal Determinants of Urban Leptospirosis Transmission: Four-Year Prospective Cohort Study of Slum Residents in Brazil**. PLoS Neglected Tropical Diseases 2016.

17. BAQUERO OS, MACHADO G. **Spatiotemporal dynamics and risk factors for human Leptospirosis in Brazil**. Scientific RepOrtS 2018; 8:15170.

18. BRASIL. **Ministério da Saúde. Leptospirose: Situação epidemiológica do Brasil no período de 2007 a 2016**. Brasília 2018;49:41.

19. MIOTTO BA, GUILLOUX AGA,TOZZI BF, et al. **Prospective study of canine leptospirosis in shelter and stray dog populations: Identification of chronic carriers and diferente *Leptospira* species infecting dogs.** Plos One 2018;11.

20. NAOTUNNA C, AGAMPODI SB, AGAMPODI TC. **Agentes etiológicos causadores de leptospirose no Sri Lanka: uma revisão.** Jornal do Pacífico Asiático de Medicina Tropical 2016;9: 390 – 394.

21. ARBOUR J, BLAIS MC, CARIOTO L. **Clinical leptospirosis in three cats (2001 – 2009).** Journal of the American Animal Hospital Association 2012;48: 256 – 260.

22. RIBEIRO TMP, SANTOS HD, SOUSA SAP, et al. **Infecção por Leptospira spp. em gatos (Felis silvestris catus). Uma Revisão.** Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal 2018;12:101-119.

23. MOSALLANEJAD B, AVIZEH R, ABDOLLAPOUR R, et al. **A serological surgey of leptospiral infection of cats in Ahvaz, South western of Iran.** Iranian Journal of Veterinary Research 2011;5:49 – 52.

24. MARKOVICH JE, ROSS L, MCCOBB E. **The prevalence of leptospiral antibodies in free roaming cats in Worcester county Massachusetts**. Journal of Veterinary Internal Medicine 2012;26: 688 – 689.

25. MURILLO A, CUENCA R, SERRANO E, et al. **Leptospira Detection in Cats in Spain by Serology and Molecular Techniques**. International Journal of Environmental Research and Public Health 2020; 17:1600.

26. SANTOS LF, GUIMARÃES MF, SOUZA GO, et al. **Seroepidemiological survey on Leptospira spp. infection in wild and domestic mammals in two distinct áreas of the semi-arid region of northeastern Brazil.** Tropical Animal Health Production 2017; 49:1715 – 1722.

27. MITTESTAINER JE, MELCHERT A, RIBEIRO JFA, et al. **Estudo soroepidemiológico da infecção por leptospira spp. em gatos** . Veterinária e Zootecnia 2015;22:465 – 470.

28. CHAN KW, HSU YH, HU WL, et al. **Serological and PCR detection of feline Leptospira in Southern Taiwan**. Vector Borne Zoonotic Diseases 2014; 14: 118 - 123.

29. ALASHRAF AR, LAU SF, KHOR KH, et al. **Serological Detection of Anti-Leptospira Antibodies in shelter cats.** Topics in Companion An Med, 2019; 34: 1-4.

30. WEIS S, RETTINGER A, BERGMANN M, et al. **Detection of Leptospira DNA in urine and presence of specific antibodies in outdoor cats in Germany.** Journal of Feline Medicine and Surgery 2016;1- 7.

31. PARREIRA IM, JAYME VS, BUZIN EJ, et al. **Epidemiological features of infection through Leptospira spp. in domestic cats (Felis catus) apparently healthy within the metropolitan área of Goiania, Brazil. Enciclopédia Biosfera** 2010;6: 1-5.

32. ALVES CJ, VASCONCELLOS AS, MORAIS ZM, et al. **Avaliação dos níveis de aglutininas antileptospiras em gatos no munícipio de Patos – PB.** Clínica Veterinária 2003;46.

33. RODRIGUEZ J, BLAIS MC, LAPOINTE C, et al. **Serologic and Urinary PCR Survey of Leptospirosis in Healthy Cats and in Cats with Kidney Disease.** J. of Veterinary Internal Medicine 2014; 28:284–293.

34. CODEIRO CT, VIEIRA RFC, OLIVEIRA ST. **Anticorpos anti-*Leptospiras spp*. e leptospirúria em gatos na região metropolitana de Curitiba/ PR – Brasil.** Archives of Veterinary Science 2017;22:131 – 138.

35. GAROUSSI MT, MEHRAVARAN M, ABDOLLAHAPOUR G, et al. **Seroprevalence of leptospiral infections in feline population in urban and dairy cattle herds in Mashhad, Iran**. Veterinary Reserch Forum 2015;6:301 – 304.

36. AZIZI PS, MOMTAZ H, GOODARZI AM, et al. **PCR detection of leptospira in stray cats, probable reservoir.** Bulletin de l'Académie vétérinaire de France 2013;166:67-70.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Presenciamos o crescente número de animais domésticos nos lares brasileiros, de modo especial, dos gatos. Essa configuração de família multi-espécie traz consigo a necessidade de ampliação dos conhecimentos relacionados a esses animais, especialmente no âmbito das doenças, ressaltando-se aquelas de interesse zoonótico, por serem representativas de risco para os tutores, além de outros coabitantes animais.

Nesse sentido, e considerando a intensa dinâmica envolvida na transmissão de agentes infecciosos, é real a necessidade de estudos que possam esclarecer hipóteses anteriormente levantadas. Logo, diversos estudos, em todo o mundo, estão sendo realizados para elucidar o papel dos felídeos na transmissão da leptospirose, uma vez que, a princípio, postulava-se que, como resultado de um processo evolutivo adaptativo, os felídeos eram refratários a essa doença.

Contudo, com o advento de novos estudos, especialmente baseados em biologia molecular, foi possível demonstrar que o envolvimento dos felinos na transmissão do agente esteja sendo subestimado. Diversos estudos já verificaram a presença de resposta imune em exemplares da espécie que, diferentemente dos cães, não são vacinados e, portanto, os anticorpos verificados são resultado de exposição natural. Além disso, também já foi demonstrada a eliminação de leptospiras viáveis por via urinária e, apesar de raros, alguns relatos de doença também já foram descritos.

Embora o envolvimento dos felídeos na transmissão desse agente e o significado do patógeno para a espécie ainda sejam fruto de controvérsias, e a relação entre leptospirose humana e felina não tenha sido bem demonstrada, não se deve descartar a importância no contexto de Saúde Pública. Assim, diante dos resultados de estudos atuais que colocam os felídeos como potenciais transmissores, é dever dos médicos veterinários conhecer o papel desses animais como sentinelas para a exposição humana e para outras espécies susceptíveis, além de informar aos tutores o potencial risco zoonótico.

O conhecimento proporciona que medidas preventivas sejam tomadas de forma eficaz e precoce; deste modo, estudos amplos, buscando estabelecer parâmetros em relação à eliminação de leptospiras por via urinária, os possíveis danos renais, os fatores de risco envolvidos e inquéritos sorológicos devem ser aprimorados para consolidar a importância das pesquisas até então realizadas e, de fato, definir o papel da espécie na cadeia epidemiológica.