

Université de Montréal

**LA LEPTOSPIROSE FÉLINE : SONDAGE SÉROLOGIQUE ET DE PCR
URINAIRE CHEZ DES CHATS SAINS ET DES CHATS ATTEINTS DE
MALADIE RÉNALE**

Par Jhoanna Rodriguez

Département de sciences cliniques
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de maître en sciences (M. Sc)
en sciences vétérinaires option sciences cliniques

Avril, 2013

© Jhoanna Rodriguez Forero, 2013

Université de Montréal

Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé

**LA LEPTOSPIROSE FÉLINE : SONDAGE SÉROLOGIQUE ET DE PCR
URINAIRE CHEZ DES CHATS SAINS ET DES CHATS ATTEINTS DE
MALADIE RÉNALE**

Présenté par

Jhoanna Rodriguez Forero

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Carolyn Gara-Boivin, présidente-rapporteuse

Marie-Claude Blais, directrice de recherche

Catherine Lapointe, codirectrice de recherche

John Fairbrother, membre du jury

Résumé

La leptospirose est une zoonose à distribution mondiale dont la prévalence chez le chat varie géographiquement de 4.8% à 35%. Bien que l'exposition féline à *Leptospira spp.* soit rapportée dans des études sérologiques, les conséquences cliniques de cette maladie chez le chat sont peu connues. Le but principal de cette étude était de comparer le statut sérologique et de porteur (PCR urinaire) de *Leptospira spp.* entre des chats sains et des chats atteints de maladie rénale (insulte rénale aigue et maladie rénale chronique de stades IIb, III et IV).

Une étude préliminaire pour valider la sensibilité et la spécificité analytiques de la PCR de *Leptospira spp.* réalisée par le Laboratoire de Diagnostic Moléculaire de la FMV sur l'urine de chat a été effectuée. La validation in vitro a démontré que la technique de PCR est efficace pour déterminer la présence de leptospires pathogènes dans l'urine du chat.

Dans le cadre de l'étude principale, 251 chats ont été recrutés entre janvier 2010 et mars 2012,. De ceux-ci, 240 ont été inclus et divisés en 2 groupes (chats sains (C=125) et chats atteints de maladie rénale (MR=115) en se basant sur un examen physique ainsi que sur des résultats d'hématologie, de biochimie et d'analyse d'urine. Tous les chats recrutés ont également été examinés sérologiquement par test de micro-agglutination pour la présence d'anticorps contre *Leptospira spp.* (résultat considéré positif si $\geq 1 : 100$) et par PCR pour la présence de *Leptospira spp.* dans l'urine.

Le pourcentage prédit de séropositivité pour *Leptospira spp.* était significativement plus élevé chez les chats atteints de maladie rénale (13,7%) que chez les chats sains (5%) ($p=0,02$). Les sérovars impliqués étaient Pomona ($n=16$), Bratislava ($n=8$) et Grippotyphosa ($n=1$). De plus, les chats séropositifs pour Pomona présentaient des titres significativement plus élevés que pour les autres sérovars ($p=0,04$). L'excrétion de *Leptospira spp.* a été confirmée par PCR dans l'urine de huit chats. Des 26 chats séropositifs, quatre (C=2, MR=2) se sont également révélés PCR positifs. La prévalence a été plus élevée chez les chats du groupe MR (5.3%;

6/113) lorsque comparée à celle du groupe C (1.6%; 2/125), mais cette différence ne s'est pas révélée statistiquement significative (C=0,9% , MR= 5,5% ; p = 0,09).

L'âge, le sexe et le milieu de vie (urbain versus rural) n'ont pas influencé le statut sérologique ou d'excrétion pour *Leptospira spp.* Le pourcentage prédit de séropositivité était significativement plus élevée chez les chasseurs ($p < 0.01$) et pendant les mois de juin à août ($p = 0.02$). La présence d'un autre chat à la maison a également significativement augmenté ce pourcentage ($p < 0.01$), mais la présence d'un chien ne l'a pas influencé. Lors de l'évaluation du PCR par le modèle GGE, seules les variables « contact avec raton laveur » et « contact avec mouffettes » sont ressorties statistiquement significatives ($p \leq 0.03$).

Le rôle que joue *Leptospira spp.* comme agent étiologique de maladie rénale chez le chat demeure incertain. Toutefois, la différence significative de statut sérologique entre les chats sains et les chats atteints de maladie rénale suggère que la leptospirose pourrait être une cause sous-diagnostiquée de maladie rénale chez cette espèce. Dans cette étude, plusieurs porteurs asymptomatiques ont été identifiés, ce qui suggère que l'espèce féline puisse être un acteur sous-estimé dans la transmission de la bactérie aux humains.

Mots-clés: Leptospirosis, Maladie rénale, chats, MAT, PCR.

Abstract

Leptospirosis is a globally widespread zoonosis, with prevalence in cats varying from 8.8% to 35% depending on geographical localization. Although serologic evidence of feline exposure exists, clinical disease is rarely reported.

This study aimed to compare seropositivity and urinary PCR status for *Leptospira spp.* between healthy cats (H) and cats with kidney disease (KD: acute kidney injury (AKI) and chronic KD stages IIb, III and IV).

The analytical sensitivity and specificity of the PCR performed by the Laboratoire de Diagnostic Moléculaire of the FMV were evaluated. In vitro validation showed that the PCR technique is effective for determining the presence of pathogenic leptospire in the urine of cats.

A total of 251 cats were recruited, from which 240 cats were enrolled. Cats were enrolled from January 2010 to March 2012 and divided into two groups, H (n=125) and KD (n=115), based on complete blood count, serum biochemistry profile and urinalysis. *Leptospira spp.* serology by microscopic agglutination test (titers \geq 1:100 considered positive) and urinary PCR were performed in all cats.

Predicted seropositivity for *Leptospira spp.* was statistically different between groups; being 5% and 13,7% in the H and KD groups respectively (p=0.02). Serovars involved were Pomona (n=16), Bratislava (n=8) and Grippotyphosa (n=1), with titers being significantly higher for Pomona (p=0.04). The excretory status was confirmed by a positive urine PCR in eight cats. Of the 26 seropositive cats, four (H=2, KD=2) were also PCR positive. The prevalence of PCR positive cats was higher in the KD group (5.3%; 6/113) compared with the H group (1.6%; 2/125), but the difference between groups did not reach statistical significance (0.9% in H, 5.5% in KD; p=0.09).

Age, sex and rural versus urban environment did not influence serologic or PCR status for *Leptospira spp.* Predicted seropositivity was greater between June and August (p =0.02) and in known hunters (p<0.01). The presence of another cat at home also increased significantly the

predicted seropositivity ($p < 0.01$), although the presence of a dog did not. When evaluating the PCR status of cats in the GEE model for individually tested variables, only the variables “contact with raccoons” and “contact with skunks” were statistically significant ($P \leq .03$).

Although the precise role of *Leptospira spp.* as an etiologic agent of feline KD remains unclear, the significant difference in the serologic status found between H and KD cats suggests that it may be an under-diagnosed cause of KD in cats. Several asymptomatic carriers were identified, suggesting that cats could be underestimated players in the transmission of the bacteria to humans.

Keywords: Leptospirosis; Kidney disease; Feline; MAT; PCR.

Table des matières

Résumé	i
Abstract.....	iii
Table des matières	v
Liste des tableaux	ix
Liste des figures	x
Liste des sigles et des abréviations	xi
Dédicace.....	xiii
Remerciements.....	xiv
Introduction.....	1
Chapitre 1. Revue de la littérature	4
1 La leptospirose.....	5
1.1 Historique et classification.....	5
1.2 Épidémiologie	9
1.2.1 Voies de transmission	9
1.2.2 Réservoirs.....	9
1.2.3 Situation épidémiologique.....	12
1.3 Physiopathologie	17
1.3.1 Les étapes de l'infection	17
1.3.2 Facteurs de virulence.....	19
1.3.3 Réponse immunitaire de l'hôte	20
1.4 Présentation clinique	21
1.4.1 Manifestation clinique chez le chien	21

1.4.2	Manifestation clinique chez les animaux de consommation.....	23
1.4.3	Manifestation clinique chez les équins.....	23
1.4.4	Manifestation clinique chez l'humain.....	24
1.4.5	Trouvailles de laboratoire	24
1.4.6	Trouvailles radiographiques et échographiques	25
1.5	Méthodes diagnostiques	26
1.5.1	Détection des anticorps anti-leptospires.....	26
1.5.2	Détection des leptospires	29
1.6	Traitement et prévention	35
1.6.1	Traitement	35
1.6.2	Prévention.....	36
1.6.3	Aspect zoonotique	38
2	La leptospirose chez le chat	40
2.1	Prévalence.....	40
2.2	Infections expérimentales	42
2.2.1	Manifestation clinique et séroconversion	42
2.2.2	Examen post-mortem	43
2.3	Cas cliniques.....	45
2.3.1	Manifestation clinique	46
2.3.2	Examen post-mortem	46
2.4	État de porteur.....	47
Chapitre 2: Hypothèses et objectifs		48
1	Hypothèses:.....	49
2	Objectifs:.....	49
Chapitre 3 : Étude prospective sur la leptospirose féline.....		50

1	Article : Détermination de la sensibilité et de la spécificité analytiques de la technique de PCR de <i>Leptospira interrogans</i> sur l'urine de chat ensemencée	51
1.1	Résumé	52
1.2	Introduction	53
1.3	Matériel et Méthodes.....	54
1.3.1	Matériel.....	54
1.3.2	Amorces	54
1.3.3	Méthodes.....	55
1.4	Résultats	57
1.4.1	Sensibilité.....	57
1.4.2	Spécificité analytique.....	59
1.5	Discussion	60
1.6	Conclusion.....	61
1.7	Références	62
1.8	Tableau	65
2	Article: Feline leptospirosis: serologic and urinary PCR survey in healthy cats and in cats with kidney disease.....	66
2.1	Abstract.....	67
2.2	Introduction	68
2.3	Materials and Methods.....	69
2.3.1	Case selection criteria.....	69
2.3.2	Sample size determination	69
2.3.3	Procedures.....	70
2.3.4	Statistical Analysis.....	70
2.4	Results.....	72
2.5	Discussion	74

2.6	Conclusion.....	78
2.7	Footnotes.....	79
2.8	References	80
2.9	Tables.....	86
Chapitre 4 : Discussion.....		93
Conclusion.....		103
Bibliographie		105
Annexes		xv
Annexe 1: Questionnaire		xviii

Liste des tableaux

Tableau I. Souches de référence de l'Institut Pasteur pour les 20 espèces décrites à ce jour dans le genre <i>Leptospira spp.</i>	7
Tableau II. Sérogroupes et sérovars isolés chez des chiens atteints de leptospirose (infection naturelle ou inoculation expérimentale)	8
Tableau III. Leptospirose: hôtes primaires et accidentels des sérovars les plus communs.	11
Tableau IV. Tableau comparatif des études de séroprévalence.....	41
Tableau V. Tableau comparatif d'infections expérimentales à <i>Leptospira spp</i> chez le chat	44
Tableau VI. Tableau comparatif des études cliniques.....	45
Tableau VII. Souches de leptospires non pathogènes et pathogènes utilisées pour la détermination de la sensibilité et/ou de la spécificité analytiques de la technique de PCR étudiée.	65
Tableau VIII. Prévalence (%) et intervalles de confiance (IC) des chats positifs selon le test (MAT ou PCR) et par groupe (contrôle vs. maladie rénale).....	95
Tableau IX. Distribution des chats positifs au MAT selon le séovar ayant le titre le plus élevé (n=25*)	95
Tableau X. Suivi sérologique de sept chats séropositifs.....	97
Tableau XI. Distribution (nombre et pourcentage) des chats avec maladie rénale (n=115), selon le type et le stade	102

Article

Table i. Percentage of seropositive and PCR positive cats for <i>Leptospira spp.</i> according to potential risk factors	86
Table ii. Hematology, serum biochemistry and urinalysis laboratory values in H and KD cats.....	88
Table iii. Percentage of H and KD cats with glucosuria, bilirubinuria and cristalluria	90
Table iv. Individual MAT titers results of seropositive cats.	91
Table v. Results from multivariate logistic regression analysis predicting a positive MAT status in cats (n=239) ^a	92

Liste des figures

Figure 1. Résultats de PCR évaluant la sensibilité analytique.....	58
Figure 2. Résultats de PCR évaluant la spécificité analytique.....	59

Liste des sigles et des abréviations

ACVIM: American College of Veterinary Internal Medicine

A/G: Albumin/globulin

AKI: Acute kidney injury

ALT: Alanine aminotransférase

AST: Aspartate transaminase

C: Contrôle

CBC: Complete blood count

CIVD : Coagulation intravasculaire disséminée

CK: Creatine kinase

CI: Confidence intervals

CKD: Chronic kidney disease

ELISA: Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

FMV : Faculté de médecine vétérinaire

GGE : Generalized estimating equations

H: Healthy

Hb: Hemoglobin

IRA: Insulte rénale aiguë

IRIS: International Renal Interest Society

KD: Kidney disease

LCR : Liquide céphalorachidien

LEPAQ : Laboratoire d'Expertise en Pathologie Animale du Québec

LPS : Lipopolysaccharide

MAT : Test de micro-agglutination, microscopic agglutination test

MRC : Maladie rénale chronique

MAPAQ : Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec

OMS : Organisation mondiale de la santé

PCR : Polymerase chain reaction

PU/PD : Syndrome polyurique-polydipsique, polyuria and polydipsia

SUN: Serum urea nitrogen

USG: Urine specific gravity

WBC: White blood cell

Dédicace

À ma famille pour sa patience et son encouragement.

À ma sœur pour son soutien inconditionnel.

Remerciements

Je tiens à remercier sincèrement ma directrice de recherche Dre Marie-Claude Blais qui a accepté de m'encadrer tout au long de ces trois années. Elle a été toujours très disponible pour me guider et m'encourager malgré ses deux congés de maternité. C'est une femme exceptionnelle et très dévouée pour la recherche. Merci pour tes conseils, mais surtout pour ta patience. Nous avons compris ensemble que ce n'est pas toujours facile de travailler dans trois langues différentes.

Je remercie également Dre Julie Arsenault pour son aide précieuse lors des analyses statistiques.

Merci aux Dres Catherine Lapointe, Lisa Carioto et Josée Harel pour leur implication dans la rédaction du manuscrit.

Merci également aux généreux donateurs du Fonds de Santé des Animaux de Compagnie (FSAC) et à l'Association des Médecins vétérinaires du Québec en pratique des petits animaux (AMVQ) pour avoir soutenu financièrement cette étude.

Introduction

La leptospirose est une maladie zoonotique ré-émergente à distribution mondiale causée par des spirochètes pathogènes du genre *Leptospira*. Toujours d'actualité, la leptospirose a été étudiée en détails chez l'espèce canine, tant au niveau de la médecine thérapeutique que préventive. À l'opposé, l'implication de *Leptospira* chez le chat demeure obscure. Bien que plusieurs études de séroprévalence aient été publiées, le rôle de la leptospirose dans l'évolution de la maladie rénale et/ou hépatique chez le chat est peu connu. En fait, des tests spécifiques pour diagnostiquer les infections à *Leptospira spp.* sont rarement effectués par les vétérinaires, puisque cette bactérie est peu reconnue comme agent causal de maladie chez le chat.

À première vue, l'espèce féline semble résistante à la maladie, autant suite à une exposition naturelle qu'expérimentale. De plus, peu d'information est disponible sur la signification clinique de la présence dans le sérum des anticorps contre la leptospirose chez le chat. La description de quelques cas cliniques révèle que les leptospires peuvent tout de même être pathogènes pour le chat, causant principalement des dommages rénaux et hépatiques. D'ailleurs, une étude française a démontré une séroprévalence pour la leptospirose significativement plus élevée chez des chats atteints d'un syndrome polyurique-polydipsique (PU/PD) que dans une population contrôle de chats sains. Enfin, trois cas cliniques de leptospirose associée à une atteinte rénale ont été rapportés chez le chat au Québec récemment. Nous avons donc été incités à investiguer son implication clinique chez cette espèce.

Ainsi, le but principal de cette étude était de comparer la séroprévalence pour *Leptospira spp.* et l'excrétion urinaire de *Leptospira spp.* par PCR entre des chats sains et des chats atteints de maladie rénale au Québec.

Dans un premier temps, une recension des écrits sur la leptospirose en général, puis plus spécifiquement sur la leptospirose féline, est présentée. Dans un deuxième temps, vous trouverez une étude préliminaire sous forme d'article scientifique portant sur la validation du test de PCR pour la leptospirose sur l'urine de chats, tel qu'effectué par le Laboratoire de Diagnostic Moléculaire de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal. Par la suite, l'étude principale est insérée sous forme d'article scientifique. Finalement, le dernier

chapitre contient une discussion de nos résultats de recherche, ainsi que la conclusion de notre étude.

Chapitre 1. Revue de la littérature

1 La leptospirose

1.1 Historique et classification

La leptospirose est une maladie bactérienne mondialement reconnue, qui affecte de nombreuses espèces de mammifères incluant l'humain. Elle est considérée comme la zoonose la plus répandue dans le monde. [1, 2] Mis à part les problèmes de santé humaine, elle est source d'importantes pertes économiques dans les élevages. [2-4] Chez l'humain, la leptospirose a été décrite pour la première fois en 1886 [5], bien que les leptospires pathogènes aient été isolées pour la première fois, et de façon simultanée, en 1915 en Allemagne et au Japon. [2] Par la suite, plusieurs études expérimentales menées par le groupe de recherche japonais ont permis d'établir la morphologie et les principaux mécanismes d'action de la bactérie, ainsi que le rôle du rat comme réservoir. [6] Chez le chien, la maladie a été reconnue dès 1933. [7] En 1938, l'infection chez le chat et le portage rénal sont finalement décrits pour la première fois. [8]

La leptospirose est causée par une bactérie gram négatif pathogène qui appartient au genre *Leptospira*. Ce dernier appartient à la famille *Leptospiraceae* et à l'ordre *spirochaetales*. Les bactéries du genre *Leptospira* mesurent de 6 à 12 micromètres de long et 0.1 micromètres de large. La bactérie est spiralée, flexible, mobile, avec des extrémités en crochet et un flagelle périplasmique. [9, 10]

Avant 1983, la classification était basée uniquement sur des critères sérotypiques définis par le test de micro-agglutination (MAT). Ce dernier permettait de répartir les souches de leptospires en plusieurs sérovars, eux-mêmes regroupés en deux espèces : l'espèce *Leptospira interrogans* comprenant tous les sérovars pathogènes et l'espèce *Leptospira biflexa* comprenant les sérovars non pathogènes. [11] Dans les dernières années, l'utilisation de différentes techniques comme l'hybridation, l'électrophorèse en champ pulsé, l'amplification génétique et la comparaison de séquences partielles des ARN ribosomiaux 16S a donné lieu à une nouvelle classification basée sur la génomique. Celle-ci a permis de reconnaître 20 espèces ou

« *genomospecies* », où les sérogroupes sont formés par la réunion des sérovars antigéniquement rapprochés. Actuellement, plus de 300 sérovars de leptospires distincts sont reconnus et regroupés en 20 espèces. Six espèces sont saprophytes, neuf espèces sont pathogènes et cinq espèces sont dites intermédiaires, puisque leur virulence n'a pas été démontrée expérimentalement. (Tableau I) [2, 12-14]

Tableau I. Souches de référence de l'Institut Pasteur pour les 20 espèces décrites à ce jour dans le genre *Leptospira spp.*

Espèces	Sérogroupe	Sérovars	Souches
Pathogènes			
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	Fiocruz LI-130
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V
<i>L. noguchii</i>	Panama	Panama	CZ 214 K
<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	Sejroe	M84
<i>L. weilli</i>	Celledoni	Celledoni	Celledoni
<i>L. santarosai</i>	Tarassovi	Atlantae	LT81
<i>L. alexanderi</i>	Manhao	Manhao 3	L 60
<i>L. alstonii</i>	ND	Sichuan	79,601
<i>L. kmetyi</i>	ND	ND	Bejo-Iso 9
Intermédiaires			
<i>L. wolffii</i>	ND	ND	Korat-H2
<i>L. licerasiae</i>	ND	Varillal	VAR010
<i>L. inadai</i>	Tarassovi	Kaup	LT64-68
<i>L. fainei</i>	Hurstbridge	Hurstbridge	BUT6
<i>L. broomii</i>	Undesignated	ND	5399
Saprophytes			
<i>L. wolbachii</i>	Codice	Codice	CDC
<i>L. meyeri</i>	Semarang	Semarang	Veldrat
<i>L. biflexa</i>	Semarang	Patoc	Patoc 1
<i>L. vanthielii</i>	Holland	Holland	WaZ Holland
<i>L. terpstrae</i>	ND	ND	LT 11-33
<i>L. yanagawae</i>	Semarang	Saopaulo	Sao Paulo

Tableau tiré de *Picardeau*, 2013. N.D. : Non déterminé.

À titre de référence, les sérovars les plus fréquemment observés dans les cas de leptospirose canine sont : Canicola, Icterohaemorrhagiae, Grippytyphosa, Pomona, et Bratislava. (Tableau II) [9, 15, 16]

Tableau II. Sérogroupes et sérovars isolés chez des chiens atteints de leptospirose (infection naturelle ou inoculation expérimentale)

Espèce	Sérogroupes	Sérovars	Pays
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	États-Unis, France
	Canicola	Canicola	Inde, États-Unis
	Pomona	Pomona	États-Unis
	Australis	Bratislava	États-Unis
	Sejroe	ND	Allemagne
	Autumnalis	Autumnalis	Inde, France
	Djasiman	Buenos Aires	Argentine
	Ballum	Ballum	États-Unis
<i>L. kirschneri</i>	Grippytyphosa	Grippytyphosa	États-Unis
<i>L. noguchii</i>	Australis	ND	Brésil

Tableau tiré de *Sykes et al*, 2011. N.D. : Non déterminé.

1.2 Épidémiologie

1.2.1 Voies de transmission

La leptospirose est transmise par contact direct ou indirect. La transmission directe se produit par le contact avec les urines et les sécrétions d'animaux infectés, puis la pénétration de la bactérie à travers la peau et les muqueuses. La transmission indirecte se fait par contact avec l'eau, le sol ou les aliments contaminés par l'urine d'animaux infectés. Les eaux et les sols souillés par les urines des animaux infectés, souvent celles des rats, assurent la survie et la dissémination des leptospires et constituent le principal mode d'infection. [9] Les produits d'avortements causés par la leptospirose sont aussi une source de contamination. [17] Finalement, les carcasses d'animaux morts peuvent également être une source d'infection, puisque les leptospires peuvent y survivre pendant 9 à 12 jours. [2, 18]

Les leptospires sont incapables de se multiplier dans l'environnement. Par contre, avec des conditions environnementales favorables, elles peuvent survivre plusieurs semaines [2, 19], et même jusqu'à 6 mois si le sol est saturé d'urine. [2, 9, 19] Les températures ambiantes comprises entre 0 et 25°C favorisent la survie des leptospires, alors que la congélation diminue nettement leur survie et les rayons ultraviolets les inactivent. D'ailleurs, l'augmentation de l'incidence de la leptospirose chez le chien en fin d'été et au début de l'automne aux États-Unis et au Canada est bien documentée. [20-23]

1.2.2 Réservoirs

Chaque sérovar a pour hôte une ou plusieurs espèces animales, et chaque espèce animale peut être l'hôte de plusieurs sérovars, parfois de façon transitoire. Le réservoir primaire est

constitué par les rongeurs, en particulier les rats, mais la plupart des mammifères domestiques (e.g. bovins, équins et porcins) et sauvages peuvent jouer ce rôle. Les animaux réservoirs sont porteurs d'un ou plusieurs sérovars spécifiques auxquels ils sont peu sensibles, i.e. qu'ils ne développent habituellement pas la maladie ou du moins, se limitent à une forme chronique. [24] Par exemple, Pomona est trouvé chez les bovins et les porcins; Grippotyphosa et Hardjo sont associés aux bovins; Ballum et Icterohaemorrhagiae sont associés aux rats et aux souris; et Canicola est associé aux chiens (Tableau III). Tous les animaux infectés ont le potentiel de disséminer des leptospires dans leur urine, ce qui constitue la source la plus importante de ces bactéries pathogènes dans l'environnement.

Tableau III. Leptospirose: hôtes primaires et accidentels des sérovars les plus communs.

Sérovars	Hôtes primaires (réservoir)	Hôtes accidentels	
		Animaux domestiques et humains	Animaux sauvages
<i>L. interrogans sensu stricto</i>			
Autumnalis	Souris	Chien, humain, vache.	Rat, raton laveur, opossum
Bataviae	Chien, rat, souris.	Chien, chat, humain, vache.	Hérisson, campagnol, armadillo, musaraigne, léopard.
Bratislava	Rat, porc, cheval.	Chien, humain, vache, cheval.	Souris, raton laveur, opossum, campagnol, renard, moufette, nutria.
Canicola	Chien	Chien, chat, humain, vache, cheval, porc.	Rat, raton laveur, armadillo, mangouste, nutria, campagnol, chacal, moufette.
Ictérohaemorrhagiae	Rat	Chien, chat, humain, vache, cheval, porc.	Souris, raton laveur, opossum, renard, marmotte, singe, moufette.
Hardjo	Vache	Chien, humain, porc, cheval, mouton.	Bovins sauvages.
Pomona	Vache, porc, moufette, opossum.	Chien, chat, humain, cheval, mouton, chèvre, lapin.	Souris, raton laveur, loup, renard, lion de mer, chevreuil.
<i>L. kirshneri</i>			
Grippotyphosa	Campagnol, raton laveur, moufette, opossum.	Chien, chat, humain, vache, mouton, chèvre, lapin, gerbille.	Souris, rat, renard, écureuil, lynx, musaraigne, rat musqué, belette, taupe, léopard.

D'après les données de Greene, 1998 ; Stokes, 2004 et John K, 2004

1.2.3 Situation épidémiologique

L'épidémiologie varie d'une zone géographique à une autre, selon l'écosystème et les conditions de vie. Ainsi, la leptospirose a une distribution mondiale, mais son incidence est plus élevée dans les régions tropicales que dans les régions tempérées. [25]

Plusieurs rapports de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) [26-29] démontrent l'aspect émergent de la leptospirose. Ceci est principalement dû aux changements climatiques (réchauffement de la planète et phénomènes climatiques extrêmes) et aux variations démographiques (accroissement constant de la population vivant dans des bidonvilles). Les données épidémiologiques, à la fois pour les humains et pour les animaux, demeurent toutefois limitées. [12] De plus, l'existence de porteurs asymptomatiques rend l'épidémiologie de la leptospirose très complexe.

1.2.3.1 Leptospirose humaine

La leptospirose est un problème de santé publique dans plusieurs pays d'Amérique latine, de l'Océanie, des Caraïbes et d'Asie du Sud-Est. [12, 30] De plus, la prévalence est élevée dans les régions du Pacifique, de l'Australie, de l'Océan Indien (sauf Madagascar) et d'Amérique Centrale. Par contre, en Europe, elle est modérée. [31] En 1999, l'OMS estimait à plus de 500 000 le nombre de cas sévères de leptospirose annuellement dans le monde, avec un taux de mortalité supérieur à 10 %. [26] En 2010, l'OMS estimait à 0,1 à 1 par 100 000 habitants l'incidence annuelle de la leptospirose dans les régions tempérées, et à 10 par 100 000 habitants dans les régions tropicales. [32]

En Amérique du Nord, la leptospirose n'est pas considérée endémique, ce qui explique probablement le peu de données épidémiologiques sur l'ensemble de la population. En fait, moins de 100 cas ont été rapportés entre 1984 et 1994 aux États-Unis d'après le centre d'information sur la leptospirose. Au Canada, la leptospirose est une maladie à déclaration

obligatoire depuis 2003, mais les cas déclarés sont sporadiques. Par exemple, des études effectuées au Québec chez des communautés cries ont démontré des séroprévalences variables selon la région, par exemple 14% au Mistissini et 23% à la Baie-James. [33-35] Les activités de chasse et de trappe ressortent comme un facteur de risque dans ces études. En fait, les trappeurs constituent une population à risque pour les maladies zoonotiques. Au Québec, une étude publiée en 1995 a révélé une séroprévalence de 5% chez un groupe de 165 trappeurs. [36] Seulement un cas de transmission du chien à l'humain est rapporté au Québec.[37]

Plusieurs facteurs de risque ont été identifiés chez l'humain, incluant les changements climatiques, les inondations, des conditions sanitaires déficientes et la présence d'un nombre élevé de réservoirs (rats).[38] Ainsi, le nombre de cas de leptospirose humaine est maximal pendant la saison des pluies. Dans les régions susceptibles aux inondations, la leptospirose peut prendre des proportions épidémiques. Au cours de la dernière décennie, l'observation d'épidémies de leptospirose suivant des inondations au Guyana, en Inde, au Kenya, en République démocratique populaire du Laos, en Nouvelle-Calédonie, au Nicaragua, aux Philippines et en Thaïlande a confirmé la présence d'un lien étroit entre la leptospirose et les événements climatiques extrêmes. [29]

La leptospirose est considérée comme une maladie professionnelle; les infections chez les agriculteurs, les vétérinaires, les travailleurs des abattoirs et les inspecteurs de viande se produisent par contact direct avec les animaux infectés. [2] Malgré le risque d'infection connu chez le vétérinaire, peu d'études ont été réalisées. Le risque de transmission pour les vétérinaires des animaux de consommation a bien été documenté [39, 40], mais moins chez les vétérinaires des animaux de compagnie. [41, 42] Ainsi, l'incidence et la prévalence de la maladie dans cette population demeurent incertains. Toutefois, une étude récente réalisée aux États-Unis chez 511 vétérinaires assistant à la convention annuelle de l'American Veterinary Medical Association a démontré une séroprévalence de 2.5%. [43] La transmission aux propriétaires d'animaux a également été rapportée. [2] Toutefois, une étude évaluant la séroprévalence pour *Leptospira spp.* chez des propriétaires de chiens séropositifs n'a identifié aucun humain positif. [44]

En plus de certains professionnels, les gens impliqués dans certaines activités récréatives sont également à risque. En effet, des épisodes sporadiques de leptospirose, en association avec des activités sportives aquatiques, ont été observés dans des régions où la maladie est peu fréquente comme l'Amérique du Nord et l'Europe. [30, 45-47]

1.2.3.2 Leptospirose chez les animaux

1.2.3.2.1 Faune sylvestre

La leptospirose a été trouvée chez la quasi totalité des mammifères étudiés, i.e. près de 160 espèces de mammifères à l'échelle mondiale. [1] Tel que mentionné précédemment, la faune sauvage représente un réservoir primaire important pour la leptospirose. [48, 49] Selon les auteurs de cette étude, le taux d'infection des rats par les leptospires est variable. Au Canada, par exemple, il est estimé entre 0 et 66,7 %, [50] et au Brésil, à 36 %. [51] Les rongeurs sont des vecteurs connus et des réservoirs asymptomatiques des leptospires.[27] Des études faites au Canada et aux États-Unis montrent que les mouffettes et les ratons laveurs sont aussi des réservoirs primaires importants. [49, 52, 53] Au Québec une enquête sérologique faite par le MAPAQ en 2007 a démontré une séroprévalence importante chez les ratons laveurs (56,1%) et les mouffettes (25%) dans le sud de la Montérégie, principalement pour les sérovars Grippotyphosa, Automnalis, Pomona et Bratislava. [54]

1.2.3.2.2 Animaux présentant une manifestation clinique

Ici et au travers de la recension de littérature de la maîtrise, nous avons choisi d'élaborer spécifiquement sur le chien, les bovins et les équins, parce qu'il s'agit des animaux chez qui la maladie clinique se manifeste et est rapportée.

Chez le chien, le nombre de cas de leptospirose au Canada a augmenté dans la dernière décennie. [42, 55] Au Québec, le nombre de chiens séropositifs a atteint un sommet au cours de l'année 2007. [37] En 2002, une étude rétrospective menée aux États-Unis et au Canada démontrait déjà une augmentation légère de la prévalence entre 1983 et 1998. [56] Dans cette étude, beaucoup de facteurs confondants entraient en jeu, à savoir : l'augmentation de contact avec la faune sylvestre, les nouvelles procédures diagnostiques et la diminution de la vaccination à cause de réactions adverses.

Plusieurs facteurs de risque ont été identifiés chez le chien. Comme chez l'humain, la saisonnalité de la maladie est très marquée dans les zones tempérées, avec une recrudescence à l'automne, liée à la chaleur et aux précipitations.[57] Toutefois, les variations climatiques annuelles et mensuelles suggèrent une exposition potentielle à l'année longue. [58] Ainsi, *Ward et al* ont constaté une incidence plus marquée aux États-Unis entre août et novembre, attribuée principalement aux baignades plus fréquentes des chiens. [23] Les chiens de chasse sont également plus à risque, car ils sont fréquemment en contact avec des plans d'eau en automne. [56] Finalement, les chiens mâles sont possiblement plus à risque que les femelles, ainsi que les chiens âgés de 4 à 10 ans par rapport aux chiens de moins d'un an. [56, 58, 59]

Chez les bovins, la séroprévalence est variable selon la région géographique. [31, 60-64] L'impact économique chez les éleveurs bovins est d'importance en considérant la baisse de la production laitière et les avortements associés à la maladie. Les cas d'avortement et de stérilité sont associés principalement aux sérovars Pomona et Hardjo pour cette espèce. [63, 65, 66] Au fil des années, quelques facteurs de risque ont été identifiés. Premièrement, *Prescott et al* a démontré une augmentation de la séroprévalence à Hardjo et Pomona avec l'âge. [63] Deuxièmement, le co-pâturage avec d'autres espèces, principalement les porcins, a été incriminé au Brésil. [65] Finalement, l'association entre les précipitations et l'augmentation des cas de leptospirose a aussi été suggérée. [67]

Les bovins peuvent également devenir des porteurs chroniques du sérovar Hardjo et ainsi servir de réservoirs pour l'infection d'autres bovins et d'humains. Par exemple, une étude réalisée en Irlande a isolé le sérovar Hardjo à partir de prélèvements rénaux chez 57 vaches examinées sur 200. [68]

Des enquêtes sérologiques réalisées au Canada, aux États-Unis, en Australie et en Italie suggèrent que les infections à leptospires sont fréquentes chez les équins, avec des séroprévalences qui varient entre 1,5% et 28,6 %. [69-73] La séroprévalence augmente avec l'âge [73, 74] et avec l'accès à l'extérieur. [74]

1.3 Physiopathologie

1.3.1 Les étapes de l'infection

La physiopathologie de la leptospirose est classiquement décrite en trois phases. Tout d'abord, il y a une phase d'invasion au cours de laquelle les bactéries pénètrent l'organisme. Durant la phase de dissémination, les leptospires vont passer dans le compartiment vasculaire où elles vont se multiplier et migrer dans les organes cibles (foie, reins) pour continuer à s'y multiplier. Éventuellement, dans une troisième phase, elles seront excrétées dans l'environnement, principalement via l'urine. [2]

1.3.1.1 Phase d'invasion de l'hôte

La phase d'invasion ou de contamination commence quand les leptospires pénètrent l'organisme, soit suite à un contact direct ou indirect. Les bactéries entrent ainsi dans le corps principalement par la peau lésée ou par les muqueuses, telles la conjonctive ou les voies digestives. [75] Dans le système digestif, la pénétration se produit probablement au niveau de la muqueuse buccale ou œsophagienne, car les leptospires ne peuvent survivre dans un environnement acide. Les leptospires peuvent aussi traverser la peau saine et leur mobilité contribue à leur diffusion dans les tissus. Il n'y a pas d'afflux de cellules inflammatoires au niveau de la voie d'entrée de la bactérie. [76]

Après avoir traversé la barrière muco-cutanée, les leptospires gagnent l'espace vasculaire qui constitue un milieu propice à leur multiplication.

1.3.1.2 Phase de dissémination

L'étendue des dommages au niveau des organes internes dépend de la virulence de la souche, mais également de la susceptibilité génétique de l'hôte. Ainsi, la maladie chez l'hôte primaire est habituellement plus chronique ou asymptomatique avec une faible réponse immunitaire, tandis que chez l'hôte accidentel, la maladie a tendance à être aiguë et sévère, avec une production très marquée d'anticorps. [2, 15]

Pendant cette phase, la leptospirémie est variable et perdure de 4 à 12 jours suite à l'exposition initiale. [77] Les leptospires non virulentes peuvent être lysées par le système anticorps/complément. Par contre, les souches virulentes peuvent échapper au système immunitaire. [77]

La septicémie produite pendant cette phase permet la dissémination des bactéries dans les organes cibles (i.e. les reins, le foie et les poumons), provoquant la symptomatologie classique. Initialement, les leptospires vont diffuser principalement vers le foie et les reins, bien que les poumons, les organes génitaux, le tube digestif, le système nerveux central et oculaire peuvent également être infectés. L'insulte rénale aiguë (IRA) est fréquente puisque la colonisation rénale survient chez la majorité des animaux infectés. En fait, l'organisme se réplique et persiste dans les cellules épithéliales des tubules rénaux, et ce même en présence d'anticorps neutralisants.

L'adhésion des leptospires aux cellules est primordiale pour la colonisation des tissus de l'hôte, mais les mécanismes qui permettent cette étape ne sont pas encore reconnus. [78, 79] Les protéines membranaires joueraient un rôle important en permettant aux leptospires de s'attacher à la fibronectine et au collagène de l'hôte. [2] La pénétration intra-cellulaire des leptospires a été démontrée *in vivo* dans le foie et le rein, ce qui explique les phénomènes d'échappement à la réponse immunitaire. [79]

1.3.1.3 Phase d'excrétion

L'hôte devient excréteur lorsque les leptospires atteignent les cellules épithéliales des tubules rénaux. Une fois dans les tubules rénaux, les bactéries sont protégées des effets bactéricides des anticorps déjà en circulation et elles ne stimulent plus la production d'anticorps. Ceci explique que les animaux puissent être séronégatifs malgré une excrétion rénale confirmée. [80]

1.3.2 Facteurs de virulence

Le pouvoir pathogène des leptospires est associé à différents facteurs de virulence. Les mécanismes par lesquels les leptospires causent la maladie ne sont pas bien compris. Les toxines et les enzymes produites par les leptospires peuvent contribuer à leur pathogénicité. Les caractéristiques cliniques et pathologiques de l'infection suggèrent qu'une endotoxine, la lipopolysaccharide (LPS), stimule l'adhésion des neutrophiles et l'activation des plaquettes et est impliquée dans la réponse inflammatoire et les troubles de coagulation observés. [15] Plusieurs laboratoires ont isolé des leptospires une substance ressemblant à une lipopolysaccharide, mais sa contribution à la pathogénèse de la leptospirose n'a pas été démontrée. [81] Des hémolysines, comme des sphingomyélinases, des porines, [82-84] et des lipases [85] ont été isolées chez certaines souches. [2]

Chaque sérotype possède une virulence particulière pour chaque espèce animale. Les sérovars ayant une action hémolytique varient d'une espèce animale à l'autre. Par exemple, le sérovar Canicola est associé à une phospholipase C, [2] et aura une virulence proportionnelle à la concentration en phospholipides de la membrane érythrocytaire de l'hôte. La lyse des globules rouges entraîne des lésions au niveau des capillaires sanguins, provoquant ainsi des saignements et parfois des troubles de la coagulation (CIVD, hyperfibrinolyse et

thrombocytopénie). [9] La virulence des sérovars Pomona, Ballum, Hardjo et Tarassovi est associée à une sphingomyélinase. [2]

En pratique, on associe sans confirmation bactériologique les phénomènes hémorragiques et l'ictère à Icterohaemorrhagiae et la néphrite à Canicola. Toutefois, les études cliniques chez le chien n'ont pas identifié d'association directe entre les systèmes affectés et les sérovars impliqués. [86] Par contre, il semble que lorsque l'animal est infecté par le séovar Icterohaemorrhagiae, il finit souvent par développer une hépatonéphrite suraiguë ou aiguë. Si l'infection se fait par Canicola, les chiens développent plutôt une néphrite aiguë (Maladie de Stuttgart). [15, 87]

1.3.3 Réponse immunitaire de l'hôte

Parallèlement à cette infection tissulaire, une réaction immunitaire spécifique consistant en l'apparition d'anticorps de type IgG et IgM détectables une dizaine de jours suite à l'inoculation se développe. Cette réaction pourrait conduire à certains phénomènes comme l'anémie hémolytique auto-immunitaire, l'uvéite ou la néphrite interstitielle. [2]

Dans certains cas, un taux très élevé d'IgM anti-leptospores peut provoquer une activation excessive du complément, causant une forte réaction inflammatoire caractérisée par une augmentation de la perméabilité vasculaire, de l'œdème interstitiel, de la diathèse hémorragique, une leucocytose lymphoplasmocytaire et possiblement une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD). [15]

Des travaux expérimentaux chez les singes ont mis en évidence une relation proportionnelle entre l'intensité des lésions tissulaires et la production d'anticorps. [88] De façon similaire, une étude rétrospective brésilienne chez l'humain a démontré que plus cette réponse immunitaire est intense et précoce, plus la maladie est grave.[89]

1.4 Présentation clinique

La manifestation clinique de la maladie est extrêmement variable, étant sous l'influence de plusieurs facteurs : la pathogénicité de la souche, la dose infectieuse, la voie de pénétration, mais aussi l'espèce animale infectée, l'âge et l'immunité de l'hôte. [2, 90] Ainsi, l'infection peut être asymptomatique ou provoquer un syndrome clinique avec IRA, insuffisance hépatique et/ou troubles de la coagulation.

La littérature est très abondante pour la description clinique de la leptospirose chez le chien. Puisque toutes les formes cliniques ont été décrites chez le chien, la manifestation de la maladie sera d'abord décrite chez cette espèce, suivi par les animaux de consommation, les équins et l'humain. La manifestation de la maladie chez le chat sera décrite la section de la revue de littérature traitant spécifiquement de cette espèce.

1.4.1 Manifestation clinique chez le chien

La leptospirose peut se présenter sous plusieurs formes : suraiguë, aiguë, subaiguë ou chronique.

La **forme suraiguë** est rare et se manifeste par une leptospirémie massive, un état de choc et une mort subite avec peu ou pas de signes cliniques spécifiques (hyperthermie, déshydratation rapide et troubles de la coagulation). [42] Les premiers signes cliniques lors de **forme aiguë** sont caractérisés par de la fièvre, des tremblements et de la faiblesse, puis peuvent se développer des vomissements, une déshydratation et un état de choc. [86, 90, 91] La présentation aiguë peut également être caractérisée par de la tachypnée, un pouls rapide et irrégulier et une mauvaise perfusion capillaire. [15] La diathèse hémorragique est l'une des manifestations les plus typiques. [92] Les troubles de la coagulation et la fragilité vasculaire résultent en divers signes cliniques, e.g. de l'hématémèse, de l'hématochézie, du méléna, de l'épistaxis et des pétéchies généralisés. Lors de présentation aiguë, un chien sans traitement

peut mourir d'un choc endotoxique et d'hypothermie en moins de 24 heures. Le caractère fulgurant de cette forme ne laisse pas le temps à une atteinte hépatique ou rénale de s'installer. Heureusement, la présentation aiguë est rare chez le chien.

La **forme subaiguë** est la forme la plus reconnue cliniquement. Le temps d'incubation est variable, mais dure en moyenne de trois à six jours. Les signes cliniques sont caractérisés par de la fièvre, de la prostration, des vomissements, de la diarrhée, de la déshydratation, de la polyurie, de la polydipsie, de l'oligurie et des symptômes hémorragiques tels que des pétéchies, du méléna, de l'épistaxis et de l'hématémèse. À l'examen physique, de la tachypnée, un pouls irrégulier et une diminution de la perfusion capillaire sont notés. De plus, des pétéchies peuvent être visibles au niveau des muqueuses cutanées, intestinales et/ou rétinienes. La réticence à se déplacer due à des lésions musculaires est aussi observée.

Le désordre clinique le plus fréquent est l'IRA, suivi par une atteinte hépatique. [21] En effet, la maladie rénale est observée chez la majorité des chiens. [20-22, 93] Elle peut se manifester par un syndrome PU/PD, puis progresser en oligurie et anurie. Une néphrite tubulaire peut être présente. Si le chien survit, la fonction rénale revient parfois à la normale après plusieurs semaines, mais l'atteinte peut être chronique. L'atteinte hépatique se manifeste par de l'ictère 10 jours après l'infection. Si le chien n'est pas traité à partir du moment où l'ictère et les hémorragies apparaissent, la maladie est habituellement fatale en trois à six jours. [20, 91] Une cholestase intrahépatique et une nécrose causée par l'inflammation hépatique peuvent conduire à une hépatite inflammatoire chronique ou à une fibrose hépatique.

Des signes respiratoires, principalement de la dyspnée et de la toux, sont observés dans un faible pourcentage de la population canine. Une étude récente suggère la présence d'un syndrome hémorragique pulmonaire similaire à celui décrit chez l'humain. [94] Lors de nécropsie, les altérations pulmonaires sont associées à une hémorragie pulmonaire, probablement due à des lésions endothéliales et une vasculite. Les trouvailles histologiques incluent des hémorragies pulmonaires, de la congestion pulmonaire, de l'œdème et une bronchopneumonie. [21, 95, 96]

La **forme chronique** est peu commune chez le chien et elle se caractérise par de l'ictère dû à une hépatite progressive chronique, qui se développe en l'absence d'implication d'autres

organes. En plus de l'ictère, les principaux signes cliniques sont l'inappétence, la perte de poids, la diarrhée, l'ascite et un syndrome PU/PD. [9] L'uvéite chez le chien a aussi été observée. [97]

Les **formes sub-cliniques** sont très fréquentes chez le chien. [98] Les chiens infectés peuvent être asymptomatiques de la maladie. Lorsqu'infectés avec *Canicola*, les chiens peuvent développer une néphrite chronique et devenir porteurs. [99, 100]

1.4.2 Manifestation clinique chez les animaux de consommation

Chez les animaux de consommation, bovins et porcins, les formes aiguës sont rares, touchant plutôt les jeunes animaux. La forme subaigüe se manifeste par des signes généraux discrets et des avortements fréquents. Elle peut aussi rester inapparente et mener à un état de porteur chronique. [65]

La leptospirose bovine se manifeste le plus souvent sous forme subclinique, principalement par des troubles de la reproduction : avortements, mortinatalité, infertilité et augmentation de l'intervalle entre les vêlages. [65, 101] On note également une chute importante de la production laitière chez les bovins laitiers, connue sous le nom de « milk drop syndrome ». [102] La sévérité de la maladie semble être liée à l'âge des animaux et à leur état immunitaire.

1.4.3 Manifestation clinique chez les équins

Chez les équins, la forme chronique est la plus commune. Les chevaux atteints présentent des troubles chroniques de la reproduction tels que des avortements, de la mortinatalité et des naissances prématurées. [72, 103] L'uvéite causée par la présence de leptospires et d'anticorps spécifiques dans les chambres oculaires a également été décrite cliniquement. [71, 104, 105] Contrairement à la plupart des autres espèces, la maladie rénale n'est que rarement observée,

mais quelques cas cliniques sont rapportés dans la littérature. [106-108] Une étude chez 4 chevaux inoculés expérimentalement avec le sérovar Kennewicki [109] a démontré que la maladie clinique peut être bénigne ou inapparente, car seulement 2 chevaux ont présenté des signes cliniques, consistant seulement en de l'hyperthermie. Plus récemment, un syndrome hémorragique pulmonaire a été décrit chez des poulains au Brésil et en Belgique. [110, 111]

1.4.4 Manifestation clinique chez l'humain

Bien que souvent bénigne, la maladie chez l'humain, peut conduire à une maladie rénale et même à la mort dans 10 % des cas. [112] Les manifestations cliniques sont très variables, allant de signes non spécifiques (i.e. fièvre élevée, frissons, maux de tête, douleurs musculaires et articulaires diffuses) à des atteintes rénales, hépatiques, méningées ou pulmonaires. [2, 76] Bien qu'aucun signe ne soit pathognomonique, l'existence d'un ictère conjonctival et de myalgies est particulièrement évocatrice. Les formes graves (ictéro-hémorragique ou maladie de Weil) associent une IRA, une atteinte neurologique (convulsions, coma), des hémorragies plus ou moins sévères (pulmonaires, digestives) et une pneumonie interstitielle caractérisée par de la congestion et de l'œdème pulmonaire. [112] La convalescence est longue, mais généralement sans séquelle. Des complications oculaires (uvéïte, kératite) tardives peuvent toutefois survenir.[113].

1.4.5 Trouvailles de laboratoire

L'hématologie est principalement caractérisée par une leucocytose et une thrombocytopénie, cette dernière étant présente chez plus de 58% des chiens.[93, 114] La leucopénie est habituellement présente durant la phase leptospirémique. Chez les animaux souffrant de maladie rénale, l'augmentation de l'urée et de la créatinine varie selon la sévérité de la maladie. Les changements électrolytiques tels l'hypocalcémie, l'hyponatrémie,

l'hypokaliémie, l'hyperphosphatémie et l'hypochlorémie varient selon le degré de maladie rénale et/ou gastro-intestinale. L'hyperkaliémie est rencontrée dans les cas d'anurie terminale. [15, 90] Chez les animaux avec atteinte hépatique, l'élévation des enzymes hépatiques (i.e. ALT, ALP, AST) et de la bilirubine est notée. [9, 16, 21]

On note à l'analyse urinaire principalement de la glucosurie, de la protéinurie, de la pyurie, de l'hématurie et de la cylindrurie. [21, 93] La densité urinaire est généralement basse (<1,020); les chiens peuvent présenter une urine isosthénurique dont la valeur oscille entre 1,006 et 1,012. [93]

1.4.6 Trouvailles radiographiques et échographiques

Des trouvailles radiographiques ont été rapportées chez le chien, dont une augmentation de la densité pulmonaire interstitielle associée probablement à des hémorragies pulmonaires. [15, 96, 115] L'échographie abdominale chez 20 chiens atteints de leptospirose a révélé plusieurs changements au niveau rénal, dont une néphromégalie, une pyelectasie et une augmentation d'échogénicité corticale. Également, la présence d'une bande hyperéchogène dans la médulla rénale a été observée chez des chiens atteints de leptospirose. Cette bande hyperéchogène est associée histologiquement à des hémorragies, de la congestion, de l'œdème et de la nécrose. [116] Cette trouvaille n'est toutefois pas pathognomique de la leptospirose. De l'effusion péri-rénale est également visible chez certains chiens, sans pour autant être spécifique pour la leptospirose. [116, 117]

1.5 Méthodes diagnostiques

Le diagnostic de laboratoire de la leptospirose peut être complexe et repose sur deux grandes catégories d'épreuves. D'une part, les tests de laboratoire conçus pour détecter les anticorps anti-leptospire, et d'autre part, ceux conçus pour détecter les leptospire elles-mêmes, leurs antigènes ou acides nucléiques. Aucun test utilisé seul ne possède une bonne sensibilité et spécificité. [16]

Le diagnostic peut être confirmé par culture ou par amplification génique dès la première semaine de maladie suivant l'apparition de la fièvre; ou par sérologie à partir de la deuxième semaine de maladie. Le MAT et la PCR sont les techniques les plus utilisées.

1.5.1 Détection des anticorps anti-leptospire

1.5.1.1 Le test de micro-agglutination (MAT)

Le MAT demeure la technique de référence. Le sérodiagnostic consiste à mettre le sérum à tester en présence de cultures vivantes de leptospire (souches représentatives de différents sérogroupes). Une lecture en microscopie sur fond noir permet de mettre en évidence la présence d'anticorps contre les souches de leptospire et ce, grâce à une réaction d'agglutination. Pour chaque dilution sérique, le titrage des anticorps est considéré positif lorsque 50% des leptospire sont agglutinées. Les souches de leptospire à inclure dans l'essai sont choisies en fonction de la fréquence connue de certains sérovars et de la probabilité de les rencontrer selon les critères épidémiologiques locaux. [58, 118]

La sérologie est un diagnostic tardif, qui ne peut souvent se faire qu'à partir du 8^{ième} jour de la maladie. [2, 90] De plus, elle nécessite idéalement des sérums pairés, i.e. collectés en phase aiguë et en convalescence. En fait, les anticorps agglutinants ne sont souvent pas décelables au

cours de la phase aiguë de la maladie. [119] Les IgM ne deviennent détectables que 5-7 jours après l'apparition des symptômes. Ainsi, deux sérums à intervalles de 10 à 14 jours sont nécessaires pour mettre en évidence une séroconversion. Une variation du titre convalescent de 4 fois par rapport au titre sérologique initial soutient une infection récente. [16]

La détermination du seuil de positivité peut être controversée. Par exemple, dans les zones de faible endémicité, il est conseillé d'utiliser un titre de 1:50 pendant la première semaine et de 1:100 de la deuxième à la quatrième semaine. Dans les régions à forte endémicité, un seuil minimal de 1:200 au cours de la deuxième à la quatrième semaine est recommandé.[120] Chez les animaux non vaccinés, une exposition préalable est supposée avec un seuil de positivité établis entre 1:50 et 1:100.[2] Le titre spécifique pour le sérovar responsable de l'infection peut rester positif à un taux élevé pendant des mois, [121, 122] et à un taux faible pendant des années. [121, 123, 124]

Le MAT détecte également les anticorps dus à la vaccination. [125, 126] À titre indicatif, les titres induits par la vaccination chez les chiens dépassent rarement 1:400, mais des titres supérieurs à 1:3200 ont été rapportés. Deux à trois mois après la vaccination, les titres diminuent généralement pour atteindre des niveaux de 1:100.[90] Chez le chien non vacciné, des titres de $\geq 1:800$ sont suggestifs d'une infection active, mais ne la confirment pas. L'historique vaccinal est donc essentiel à l'interprétation des résultats. [16]

Le moment du prélèvement étant important dans l'interprétation des résultats sérologiques, l'obtention de sérums pairés est essentielle. Un MAT positif peut indiquer une infection active, mais une ancienne exposition ou même un portage chroniques sont également possibles. Par exemple, l'antibiothérapie peut retarder ou diminuer l'apparition d'anticorps ou même entraîner une absence complète de séroconversion. [27]

Les réactions croisées sont fréquentes sur un sérum prélevé trop précocement et peuvent fausser le diagnostic. Elles ont toutefois tendance à disparaître en phase de convalescence. Plusieurs études suggèrent que le titre le plus élevé correspond au sérovar causal. [15, 57, 86, 125, 127, 128] Par contre, des études récentes ont démontré que le sérovar infectieux n'est pas nécessairement celui ayant le titre le plus élevé.[118, 129] Dans une étude prospective réalisée par *Smythe et al* en 2009, les résultats de MAT ont été comparés à ceux de la culture :

le sérovar infectieux a été correctement identifié par le titre le plus élevé dans seulement 33% des cas. [129] Une différence considérable entre les titres au MAT obtenus pour un même échantillon auprès de différents laboratoires a également été mise à jour lors d'une étude incluant des cas cliniques canins confirmés de leptospirose.[126]

Bien que la sérologie soit un bon outil pour faire des enquêtes de séroprévalence, elle constitue un mauvais indice d'excrétion urinaire comparativement à la détection avec le PCR urinaire. D'après une étude faite en 2003 sur 500 chiens, 8,2% se sont révélés positifs au PCR urinaire (n=41), mais seulement neuf d'entre eux avaient un titre $\geq 1:100$. [130]

Une étude récente évaluant des chiens atteints par la leptospirose et des chiens sains vaccinés a mis en évidence un manque important de sensibilité et de spécificité du MAT. La sensibilité du test MAT lorsqu'un seul titre élevé ($\geq 1:800$) est utilisé comme seule épreuve diagnostique de leptospirose se situe entre 22-67% selon le laboratoire utilisé; et la spécificité varie entre 69-100%.[126]

En résumé, les limites du MAT sont:

- Les anticorps peuvent être non détectables (faux négatif) au début de la maladie et le seront tardivement si le patient a débuté une antibiothérapie hâtivement.
- Le sérovar infectieux n'est pas nécessairement celui dont le titre sérique est le plus élevé.
- Une infection par un sérovar inhabituel, donc non présent dans l'éventail des sérovars testés par le laboratoire local, pourrait ne pas être détectée.
- Le MAT détecte également les anticorps produits par la vaccination.
- Il est nécessaire d'obtenir des sérums pairés pour interpréter des titres bas (infection active versus ancienne exposition versus porteur chronique versus post-vaccinal)
- Des réactions croisées entre sérovars peuvent fausser le diagnostic.

1.5.1.2 ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)

L'ELISA est une méthode immunoenzymatique qui se sert d'un marqueur du même nom pour mettre en évidence la liaison anticorps-antigène. Cette méthode est à la fois quantitative et qualitative, car l'intensité colorimétrique est proportionnelle à la quantité d'anticorps présents dans le sérum. L'utilisation des tests ELISA pour le diagnostic présumé de la leptospirose a été évaluée chez l'humain, les canins, les rongeurs et les bovins. [122, 131-134]

Le test ELISA permet de détecter les différentes classes d'anticorps (IgM et IgG) spécifiques pour les leptospires. [132] De cette façon, il est possible de savoir si l'animal est en phase aiguë de la maladie avec un taux élevé d'IgM ou en phase chronique avec un taux élevé d'IgG. Le test se révèle positif (IgM) vers les 8 –10e jours post-infection. Les niveaux d'anticorps IgG augmentent entre les semaines 2 et 3 post-infection, avec des titres maximaux à la semaine 4. Les anticorps décroissent sur 3 à 6 mois et peuvent persister à des taux résiduels pendant plusieurs années. La cinétique des anticorps est indispensable (2 sérologies à 2 semaines d'intervalle) et son interprétation est basée sur les données chronologiques et cliniques.

Plusieurs tests sont commercialisés, mais il existe une diversité d'antigènes utilisés. Pour cette raison, le test ELISA demeure un test de dépistage et peut faire l'objet de fausses réactions positives qui exigeront une confirmation de résultats par le MAT. [135] En plus, tout comme le test MAT, il ne permet pas de mettre en évidence le sérovar en cause. Le test ELISA est un test rapide et ses résultats sont presque similaires au test MAT. [136]

1.5.2 Détection des leptospires

1.5.2.1 Microscope à fond noir et hémagglutination indirecte

Bien que la visualisation directe des leptospires par la technique de microscopie sur fond noir soit la méthode employée pour examiner la croissance des leptospires dans la culture, elle n'est pas utile pour le diagnostic d'une infection chez l'hôte lorsqu'utilisée directement sur les fluides corporels. [91] L'observation se fait en général à partir d'urine, mais cette méthode est peu sensible et n'est utilisable que sur des animaux présentant une leptospiurie supérieure à 10^5 micro-organismes par ml d'urine. [57] Plusieurs méthodes de coloration ont été développées pour augmenter la sensibilité de détection [137, 138], mais la difficulté associée à la technique et ses faibles sensibilité et spécificité restreignent son utilisation. [120, 139] Dans une étude prospective incluant 170 patients humains, une sensibilité de 40.2% et une spécificité de 61.5% ont été obtenues lorsque la microscopie sur fond noir a été comparée à la culture. [120] La spécificité de la technique est aussi limitée parce qu'il peut s'avérer impossible de différencier les leptospires des autres spirochètes et même des débris pouvant se retrouver dans l'urine. [120].

L'hémagglutination indirecte est une technique d'agglutination disponible commercialement qui ne nécessite pas une technologie spécialisée. Elle a été décrite par *Levett et al* et permet un diagnostic précoce d'une infection à leptospire avec une sensibilité de 92,2% et une spécificité de 94,4% lorsque comparée à l'ELISA, mais elle n'est pas disponible en pratique vétérinaire. [131]

1.5.2.2 Culture

La culture permet un diagnostic de certitude, mais sa réalisation est très délicate. En effet, le développement des leptospires nécessite un milieu de culture particulier qui est variable en fonction de la souche de leptospires. La mise en culture doit être réalisée rapidement après le prélèvement. La croissance des leptospires est bonne pour certaines souches sur un milieu

avec sérum et pour d'autres souches, elle nécessite un milieu spécial (milieux semi solides avec +/- 0,2% de gélose). Des inhibiteurs sont employés pour éviter la contamination de ces milieux. Les souches pathogènes peuvent être facilement isolées lorsque le prélèvement a été réalisé dans de bonnes conditions. Ainsi, l'ensemencement doit se faire immédiatement après le prélèvement, car la survie des leptospires pathogènes est très faible dans les échantillons biologiques. La température d'incubation est normalement de 30°C. L'incubation se fait en obscurité en maintenant une agitation constante pour faciliter la croissance des bactéries. Les cultures sont observées à chaque semaine par microscopie sur fond noir. [2, 12]

L'hémoculture doit être faite dans les dix premiers jours suivant l'apparition des premiers symptômes. En effet, les animaux infectés sont leptospirémiques pendant 7 à 10 jours. Après cette période, le nombre d'organismes dans la circulation sanguine diminue alors que les titres d'anticorps augmentent. Les leptospires peuvent être isolés du LCR durant la deuxième semaine suivant le début de la maladie. L'urine demeure le fluide de choix à mettre en culture et ce, à partir de la troisième semaine post-infection. Plusieurs échantillons doivent être récoltés à cause de l'excrétion intermittente des leptospires dans l'urine. Il va sans dire qu'il est indispensable que les échantillons de culture soient prélevés avant le début du traitement anti-microbien. [12]

Lors de maladie rénale, l'alcalinisation de l'urine peut favoriser la multiplication des leptospires dans l'urine et faciliter le diagnostic par culture. [140] Par contre, la croissance des leptospires requiert plusieurs semaines (minimum de 1 mois et habituellement plus de 4 mois).[27] La culture n'est donc pas une méthode efficace de diagnostic dans un contexte clinique. De plus des leptospires non pathogènes peuvent être présentes dans les tissus des chiens en santé. [141]

1.5.2.3 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La technique de PCR détecte l'ADN des leptospires dans les échantillons. Brièvement, cette technique permet de repérer un fragment d'ADN et de le multiplier rapidement en se basant

sur une réaction enzymatique (ADN polymérase) et à l'aide d'amorces (petites séquences oligonucléotidiques). La PCR utilise de manière répétitive la propriété des ADN polymérases de ne pouvoir synthétiser un brin complémentaire d'ADN qu'à partir d'une amorce. Une PCR positive indique la présence de l'ADN des leptospires pathogènes dans l'échantillon, mais elle ne peut pas dire si les leptospires sont vivantes et ne permet pas d'identifier directement le sérovar en cause. Le test PCR est utilisé de façon fréquente comme méthode diagnostique en médecines vétérinaire et humaine.

La technique de PCR est très sensible et spécifique [130]. Elle repose sur trois étapes qui sont indispensables pour toute synthèse d'ADN et qui sont répétées plusieurs fois: dénaturation, hybridation, élongation. Tous les éléments nécessaires à la réaction sont regroupés dans un tube qui sera soumis aux différentes températures correspondant à chaque étape. Ces cycles de température sont réalisés automatiquement dans un thermocycleur. Ces trois étapes (dénaturation, hybridation, élongation) représentent un cycle que l'on peut répéter autant de fois que nécessaire. Au fil des cycles, la quantité d'amplification va augmenter de façon exponentielle.

Étant donné le grand nombre d'espèces, il faut utiliser des amorces qui permettent l'amplification de séquences communes à toutes les souches des leptospires. Plusieurs kits commerciaux sont disponibles pour l'identification des leptospires chez les chiens, les bovins et les humains. Chaque kit utilise des amorces différentes (LipL32, 16SrRNA, G1/G2 et B64-I/B64-II) [130, 142-144] et seulement quelques-uns ont été testés cliniquement. [142, 145-148]

La PCR utilisant des amorces de G1/G2 et B64-I/B64-II a été validée pour détecter les sérovars de *Leptospira* pathogènes à partir d'échantillons canins d'urine. [142] Les amorces G1 (5'CTG AAT CGC TGT ATA AAA GT3') et G2 (5'GGA AAA CAA ATG GTC GGA AG3'), amplifient un fragment d'ADN de 285 paires de bases de l'ADN de 6 sérovars de *L. interrogans* (Autumnalis, Bratislava, Canicola, Hardjo, Pomona et Icterohaemorrhagiae); tandis que les amorces B64-I (5'CTG AAT TCT CAT CTC AAC TC3') et B64-II (5'GCA GAA ATC AGA TGG ACG AT3'), amplifient un fragment d'ADN de 352 paires de bases de 2 sérovars de *L. interrogans* (Sejroe et Grippotyphosa). Ce test est couramment utilisé dans les

laboratoires de diagnostic canadiens [149], dont le Laboratoire de Diagnostic Moléculaire de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal. Il est considéré spécifique et sensible avec une limite de détection de 10 à 100 bactéries de leptospires / ml d'urine. [79, 142, 150, 151]

La PCR en temps réel utilise le principe de base de la PCR conventionnelle avec pour différence une amplification mesurée non pas en final, mais tout au long de la réaction, donc en temps réel. La quantité d'ADN est mesurée à chaque cycle d'amplification grâce à un marqueur fluorescent. Ceci permet d'obtenir une cinétique de la réaction, donc un résultat quantitatif. [144, 152] L'analyse des produits d'amplification par des courbes de fusion [150] par séquençage [153, 154] ou par électrophorèse permet de vérifier qu'un seul produit de PCR est amplifié. De cette façon, la PCR en temps réel permet d'identifier les espèces impliquées et, dans certains cas, le sérovar ou génotype.

Récemment, un test de PCR en temps réel a été développé, utilisant la technique TaqMan (système de détection par sondes).[144, 155] Ce PCR détecte le gène LipL32, également connu sous le nom Hap1, correspondant à une lipoprotéine de la surface membranaire externe des leptospires. Cette lipoprotéine semble être un facteur de virulence important, puisqu'elle est présente uniquement dans les leptospires pathogènes et ce, en quantité très abondante. [103, 156, 157] Ce PCR en temps réel a une spécificité et sensibilité de 100 % par rapport à la culture, le test ELISA et le test MAT, et permet le diagnostic rapide de la leptospirose aiguë avec une limite de détection de deux cellules/ml. [144, 155]

Vue la longueur des délais dans la détection des leptospires lors de la culture et l'apparition tardive des anticorps spécifiques, l'intérêt des PCR conventionnelle et en temps réel est évident. Elles constituent un indéniable outil épidémiologique et clinique permettant un diagnostic direct dès l'apparition des premiers signes cliniques de la maladie. [158] La PCR permet un diagnostic précoce et fiable, malgré le fait que les anticorps ne soient pas encore détectables par le MAT.

Le sang et l'urine sont habituellement utilisés pour la détection de *Leptospira spp* par PCR, mais l'humeur aqueuse, la semence et le liquide céphalorachidien peuvent très bien servir. L'ADN des leptospires est en moyenne détectable par le PCR dans le sang dès l'apparition des

premiers signes cliniques et ce, jusqu'à 10 jours après l'apparition des signes. [149, 159] Par la suite, les organismes sont détectables dans les urines. Ainsi, en début d'infection, il est conseillé d'utiliser les prélèvements de sang et en phase chronique, les échantillons d'urine.

La détection de l'ADN des leptospires par PCR effectuée sur l'urine d'animaux asymptomatiques témoigne seulement d'un état d'excréteur ou de porteur chronique. [60, 72, 80, 160, 161] Pour sa part, la vaccination n'influence pas les résultats de la PCR. [16, 162] Par ailleurs, la non détection de l'ADN des leptospires par PCR urinaire n'élimine pas la possibilité que l'animal soit un porteur rénal; ce résultat négatif peut simplement être dû à une excrétion urinaire insuffisante de leptospires pour en permettre la détection.[2] La présence d'inhibiteurs dans les échantillons peut également donner de faux négatifs. [57]

Actuellement, aucune technique de diagnostic n'est tout à fait satisfaisante. La culture et le MAT sont les méthodes de référence pour le diagnostic, mais ne peuvent pas être utilisés pour le diagnostic précoce. Par contre, le PCR peut être utilisé dans la phase aiguë, bien que de faux négatifs soient possibles. [130, 163] En clinique, la méthode diagnostique de choix pour confirmer le diagnostic de la leptospirose serait de combiner la PCR et la sérologie. Lorsque la PCR s'avère négatif, le MAT devrait être répété sur un sérum pairé environ 2 semaines plus tard. Il est à noter que la PCR sur un échantillon sanguin est possible seulement pour quelques jours au tout début de la maladie (7 à 10 jours post-infection). Plusieurs auteurs estiment qu'il y a un besoin urgent de développer de nouvelles techniques pour une détection facile et rapide d'anticorps ou d'antigènes dans la phase aiguë de la maladie.[12]

1.6 Traitement et prévention

1.6.1 Traitement

Les leptospires sont très sensibles à une grande variété d'antimicrobiens *in vitro*, [164-166] le meilleur choix parmi les agents antimicrobiens testés reste incertain. Selon le consensus de l'American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM) sur la leptospirose [16], les choix actuels de traitement de la leptospirose sont la pénicilline, la doxycycline, le céfotaxime, la ceftriaxone et l'azithromycine.

La pénicilline et la doxycycline ont traditionnellement été les antimicrobiens de choix dans le traitement des êtres humains et des chiens contre la leptospirose. L'efficacité clinique de la pénicilline G est bien documentée, mais ses désavantages (e.g. courte durée d'action, faible absorption gastro-intestinale et problèmes d'allergie) rendent son utilisation moins populaire. La doxycycline est une alternative raisonnable chez l'humain, bien qu'il existe certaines préoccupations sur sa toxicité lorsqu'utilisée chez les femmes enceintes et les enfants. [165] Les directives d'utilisation de l'OMS suggèrent de limiter l'usage de cet antibiotique à des cas moins sévères de leptospirose. [27] L'amoxicilline et l'érythromycine ont également été utilisés, mais aucun essai clinique randomisé n'a été réalisé pour supporter leur utilisation.

Le traitement des formes graves de leptospirose nécessite toujours une hospitalisation. Il repose sur des traitements de support et l'administration précoce d'antimicrobiens. En d'autres mots, on ne doit pas attendre l'obtention des résultats diagnostiques pour débiter l'administration des antimicrobiens, puisqu'un traitement hâtif diminue les risques de complications, le temps d'hospitalisation, la symptomatologie et la durée du portage rénal. Suite à l'apparition de signes cliniques, un délai de 4 à 7 jours avant le début de l'antibiothérapie défavorise la récupération clinique. [27]

Chez le chien, le consensus de l'ACVIM recommande de traiter avec de la doxycycline, administrée à raison de 5 mg/kg PO ou IV aux 12 heures pendant 2 semaines [16], bien que la

durée optimale du traitement antimicrobien doit encore être étudiée. En cas de vomissements, ou d'autres effets indésirables qui empêchent l'administration de doxycycline, les chiens doivent être traités avec de l'ampicilline (20 mg / kg IV q6 heures), avec une réduction de dose pour les chiens souffrant de maladie rénale. L'ampicilline doit être aussi favorisée en milieu hospitalier pour réduire les risques de contamination pour le personnel et les autres patients hospitalisés. La pénicilline G (25.000-40.000 U / kg IV q12 heures) pourrait également être utilisée. Une fois que les vomissements sont contrôlés, les chiens devraient recevoir de la doxycycline, pendant 2 semaines afin de bien éliminer les organismes des tubules rénaux.

Dans une infection expérimentale chez des hamsters, la doxycycline (10 mg / kg) a totalement éliminé les leptospires après 3 jours de traitement tel que détecté par une PCR quantitative; par contre, l'ampicilline (40-100 mg / kg) n'a pas réussi à éliminer les organismes au niveau rénal. [167]

1.6.2 Prévention

La vaccination est sans aucun doute une partie essentielle de la lutte contre la leptospirose, son but ultime étant de limiter les risques zoonotiques et la transmission d'agents pathogènes entre les populations animales.

La protection contre la maladie clinique et la prévention de l'état de porteur rénal restent les principaux objectifs de la vaccination contre la leptospirose chez le chien. Un chien correctement vacciné peut tout de même développer la maladie s'il est confronté à une souche sauvage ou s'il est infecté par une souche d'un sérotype non couvert par la vaccination. Ainsi, la vaccination empêche l'infection et l'état de porteur pour les sérovares vaccinaux et évite que les chiens ne développent les conséquences les plus graves de la maladie. [168-172]

En Amérique du nord, les vaccins pour les chiens sont maintenant disponibles sous 2 formes : les vaccins bivalents d'origine, contenant uniquement les sérovars Canicola et Icterohaemorrhagiae, et plus récemment, un vaccin tétravalent contre Canicola, Icterohaemorrhagiae, Grippytyphosa et Pomona. En Europe, un nouveau vaccin tétravalent inactivé contre Canicola, Icterohaemorrhagiae, Grippytyphosa et Australis a aussi été développé. [172] Suite à l'introduction du vaccin bivalent sur le marché, la prévalence globale des cas de leptospirose canine a considérablement diminué entre 1970 et 1980, pour ré-augmenter dans le milieu des années 1990. [15, 55, 173] Les nouveaux cas de leptospirose étaient alors causés principalement par les sérovars Pomona et Grippytyphosa, d'où l'ajout des souches additionnelles au vaccin. Bien que le nombre de cas de maladie clinique ait de nouveau diminué, des études sérologiques au cours des dernières années montrent une séroprévalence élevée. [16] La vaccination a permis un certain contrôle de la maladie, mais pas une maîtrise complète, possiblement en partie parce qu'elle est limitée à quelques sérovars. L'inclusion éventuelle des nouveaux sérovars s'avère envisagée afin d'obtenir un meilleur contrôle de la maladie. [174]

L'efficacité de ces vaccins est très limitée. La réponse immunitaire est de courte durée et implique le besoin de faire des rappels périodiques. Ainsi, le protocole de vaccination chez le chien comprend une primovaccination en bas âge avec un rappel 4 semaines plus tard, puis des rappels annuels. [171, 175-177]

La vaccination des porcins et des bovins aide à la prévention de la maladie, mais ne protège pas complètement de l'infection. Un vaccin monovalent contre le sérovar Hardjo [178] et un vaccin polyvalent contre les sérovars Pomona, Hardjo, Canicola, Grippytyphosa et Icterohaemorrhagiae sont disponibles pour les bovins, [179] mais les résultats ne sont pas très satisfaisants. Aucun vaccin n'est homologué pour utilisation chez les équins.

Les vaccins destinés à l'humain n'induisent pas une protection à long terme contre l'infection et ne confèrent pas une immunité protectrice croisée contre les sérovars ne figurant pas dans la composition du vaccin. Dans la pratique, le vaccin est principalement utilisé pour gérer l'exposition professionnelle. Le développement d'un vaccin polyvalent est limité chez l'humain par la diversité des sérovars, cette dernière engendrée par la variation de la structure

du lipopolysaccharide (LPS). Quelques pays, comme Cuba, utilisent des vaccins polyvalents chez l'humain, bien qu'ils ne soient pas capables de protéger contre l'ensemble des sérovars connus. [180] En France, un vaccin monovalent est offert aux travailleurs très exposés (égoutiers, personnel d'abattoirs, éboueurs), mais a une efficacité limitée. [181] Des vaccins plus performants sont donc également attendus.

Chez l'humain, l'administration orale de doxycycline 200 mg par semaine peut donner une protection à court terme dans les environnements à haut risque avec une réduction importante de la séroconversion et des conséquences cliniques de l'infection. [59, 167, 182]

La dératisation, le contrôle des effluents des élevages industriels et le drainage des zones inondées sont des mesures préventives efficaces, mais elles sont difficiles à mettre en œuvre collectivement.

1.6.3 Aspect zoonotique

Un aspect important de la maladie est son caractère zoonotique. Les humains sont facilement exposés étant donné l'étroit contact avec les animaux domestiques, dont le chien. [183] Les chiens sont considérés comme un réservoir d'infection important et une source potentielle de contamination pour les humains. [2] La transmission du chien à l'humain est cependant rare. Un cas a été signalé au Québec en 2006 chez le propriétaire d'un chien dont les symptômes étaient apparus la semaine précédente. La sérologie du chien a révélé des titres significatifs pour les sérovars Pomona (1:3200) et Grippytyphosa (1:1600). [37]

Afin de minimiser les risques de zoonose en clinique, les vétérinaires peuvent suivre des pratiques recommandées en matière de lutte contre les infections vétérinaires. Ces pratiques incluent l'hygiène complète des mains, et le cas échéant, l'utilisation de gants, la protection du visage et des voies respiratoires et le port de vêtements de protection. Bien que le port de gants ne soit pas nécessaire lors de la manipulation d'animaux en santé, il est recommandé pour les

animaux ayant des signes de maladie ou un historique médical inconnu. [184] Afin d'éviter d'entrer en contact avec l'urine des animaux infectés et de contaminer l'environnement de travail, l'installation d'un cathéter urinaire relié à un sac étanche est recommandée. Si de l'urine est répandue sur le plancher, le nettoyage et la désinfection immédiate avec une dilution à 10% d'hypochlorite de sodium ou avec une solution d'ammonium quaternaire qui inactivent les leptospires, sont de mise. [16]

2 La leptospirose chez le chat

2.1 Prévalence

Peu d'informations sont disponibles sur la prévalence d'anticorps contre la leptospirose chez le chat et surtout sur sa signification clinique. Chez cette espèce, la leptospirose clinique est beaucoup moins fréquente, du moins, elle est rarement diagnostiquée.

À première vue, l'espèce féline semble résistante à la maladie, autant à la suite d'une exposition naturelle qu'expérimentale, mais la description de quelques cas cliniques révèle que les leptospires peuvent également être pathogènes pour le chat, causant principalement des dommages rénaux et hépatiques. [18, 185-188]

La séroprévalence de la leptospirose chez le chat varie entre 4.8% et 35% selon les études disponibles depuis 1965. [48, 69, 189-197] (Tableau IV) Une prévalence de 35% a été obtenue lors d'une étude française, en utilisant un seuil de positivité de 1 :80. Les échantillons testés avaient initialement été soumis pour analyse à un laboratoire de dosages hormonaux, donc ils provenaient de chats présentant des troubles cliniques divers. (n=98) [191] Plus récemment, une étude effectuée en 2007 sur 40 chats malades présentés au Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal a démontré une séroprévalence de 25% (seuil de positivité de 1 :100). [197]

Tableau IV. Tableau comparatif des études de séroprévalence.

Auteur et année de l'étude	Pays	Nombre de chats	Titre considéré positif	Prévalence (%)
<i>Murphy, 1958</i>	États-Unis	350	1 :100	4,9
<i>Esseveld, 1940</i>	Indonésie	500	1 :100	30
<i>Lucke, 1965</i>	Angleterre	118	1 :30	6,8
<i>Everad, 1979</i>	Trinidad et Tobago	40	1 :100	12,5
<i>Shopet, 1980</i>	Nouvelle Zélande	225	1 :24	8,8
<i>Larsson, 1984</i>	Brésil	172	1 :100	12,8
<i>Batza, 1987</i>	Allemagne	165	1 :100	20
<i>Dickenson, 1993</i>	Australie	59	1 :50	16,9
<i>Agunloye, 1996</i>	Écosse	87	1 :30	9,2
<i>Luciani, 2004</i>	France	97	1 :80	35
<i>Mylonakis, 2005</i>	Grèce	99	1 :50	33,3
<i>Millan, 2009</i>	Espagne	53	1 :100	14
<i>Markovich, 2012</i>	États-Unis	63	1 :100	4,8
<i>Lapointe, 2013</i>	Canada	40	1 :100	25

2.2 Infections expérimentales

Dans le passé, plusieurs infections expérimentales ont été réalisées et beaucoup de ces dernières ont démontré que le chat est très résistant à la leptospirose et développe peu de signes cliniques. [198, 199]

2.2.1 Manifestation clinique et séroconversion

L'hyperthermie est souvent le seul signe clinique observé lors des infections expérimentales. Dans tous les cas, elle n'excède pas plus de 24 à 48 heures. [199-201] Une infection expérimentale a tout de même mis en évidence un syndrome PU/PD, mais chez un seul des douze chats inclus dans l'étude. [198] Mis à part le syndrome PU/PD sur un chat, aucun autre signe clinique n'a été observé.

Aucun chat n'est mort au cours des infections expérimentales. Suite à l'inoculation de la souche, la leptospirémie a été observée jusqu'au dixième jour [202], et la leptospiurie a été observée à partir du 12^{ième} au 15^{ième} jour [200] et ce, jusqu'aux jours 45 à 48. [199, 202] La majorité des chats ont présenté une séroconversion : les titres d'anticorps ont augmenté à partir du jour 7 et atteint le taux maximal vers le 20^{ième} jour. Dans une seule étude, la séroconversion est apparue de façon tardive, soit aux jours 28 et 42 chez 2 des 10 chats inoculés. [199] Les titres d'anticorps sont habituellement faibles et dépassent rarement 1 :100, mis à part dans l'étude de *Larsson*. Dans toutes les infections expérimentales ici répertoriées, un seul chat a obtenu des titres de 1 :3200. [199] La persistance des anticorps n'a jamais été évaluée au-delà de 3 mois, car la plus longue étude a duré 84 jours suite à l'inoculation de leptospires. [199] Il est toutefois important de mentionner que ces études expérimentales ont utilisé des doses et des routes d'inoculation différentes, possiblement inférieures à ce qui peut être retrouvé dans un contexte clinique.

2.2.2 Examen post-mortem

Bien que la majorité des chats soient asymptomatiques, des changements macroscopiques et histologiques sont habituellement observés lorsqu'une nécropsie complète est effectuée. Les lésions observées macroscopiquement au niveau rénal sont une adhésion de la capsule corticale et un cortex rénal d'aspect granulaire. Au niveau hépatique, *Fessler et Morter* ont noté une hépatomégalie et une décoloration jaunâtre marquée des espaces péri-lobulaires chez tous les chats de l'étude inoculés par une souche du sérovar Pomona. [198] L'analyse histologique des reins révèle une néphrite interstitielle et un infiltrat lymphoplasmocytaire.[198, 200] Une congestion hépatique centro-lobulaire et une dégénération peri-lobulaire ont été observés lors d'inoculation avec le sérovar Pomona, tandis qu'aucune lésion histologique n'était présente au foie avec le sérovar Ballum. [198] Le Tableau V compare les différentes études expérimentales effectuées chez le chat.

Tableau V. Tableau comparatif d'infections expérimentales à *Leptospira spp* chez le chat.

Auteur et année de l'étude	N	Mode d'infection	Sérovars infectants	Méthodes diagnostiques *	Signes cliniques	Lésions histologiques
Fessler, 1964	12	Sous-cutanée	Pomona et Ballum	MAT (11/12) Hémoculture : (3/6) Culture urinaire : (2/6)	PU/PD	Rein : Néphrite interstitielle Foie : Congestion hépatique centro-lobulaire Dégénération péri-lobulaire
Ferris, 1965	4	Intra-péritonéal Sous-conjonctivale	Pomona	MAT (3/4) Hémoculture (3/4) Culture urinaire (2/4)	Aucun	Aucune
Modric, 1978	ND	SC	Pomona	MAT	Hyperthermie	NE
Shophet, 1980	4	PO: souris infectées	Ballum	MAT (4/4) Hémoculture (4/4) Culture urinaire (4/4)	Hyperthermie Diminution de la DU	Rein : Néphrite interstitielle Foie : Normal
Larsson, 1985	10	SC	Canicola et Icterohaemorrhagiae.	MAT (9/10) Hémoculture (0/10) Culture urinaire (2/10)	Hyperthermie	NE

ND : Non disponible. NE : non effectué. DU : Densité urinaire. PU/PD : syndrome polyurique/polydipsique *Les résultats entre parenthèse représentent le nombre de chats positifs pour les différents tests effectués.

2.3 Cas cliniques

Les cas cliniques rapportés dans la littérature sont très rares. Plusieurs sérovars ont été impliqués en se basant habituellement sur le titre le plus élevé à la sérologie. Ils comprennent Pomona, [185, 187] Grippytyphosa, [188] Serjoe, [18] Australis, [186] et Bratislava. [185] (Tableau VI)

Tableau VI. Tableau comparatif des études cliniques

Auteur et année de l'étude	Nombre de chats	Sérovars	Méthodes diagnostiques	Signes cliniques
<i>Hemsley, 1956</i>	3	Canicola	MAT	MRC* Vomissement Diarrhée
<i>Rees, 1964</i>	1	Pomona	MAT	MRC*. Ictère, mort
<i>Mitcha, 1970</i>	1	Serjoe	MAT	Hyperthermie, ictère et mort
<i>Carlos, 1971</i>	1	Grippytyphosa	MAT Culture	Fièvre, ictère
<i>Masson, 1972</i>	2	Pomona	MAT Coloration à l'argent (Foie et reins)	Ictère, mort
		NE	Coloration à l'argent (Foie et reins)	Gingivite chronique, anorexie, diarrhée et vomissement, mort
<i>Bryson, 1976</i>	1	Australis	Coloration à l'argent MFN	ND
<i>Arbour, 2012</i>	3	Pomona, Bratislava	MAT	PU/PD (IRA) Signes oculaires et boiterie Mort

* Existence de maladie rénale chronique au préalable. ND : Non divulgué, car examen post-mortem seulement. NE : non effectué. MFN : Microscope à fond noir. PU/PD : syndrome polyurique/polydipsique. IRA : Insulte rénal aigüe.

2.3.1 Manifestation clinique

La description des cas cliniques de leptospirose féline révèle principalement des signes d'amaigrissement, d'hyperthermie et un syndrome PU/PD associés à la maladie rénale. Quatre études ont démontré la présence d'ictère. [19, 187, 188, 203] Un chat a également présenté des signes oculaires et de la boiterie. [185] La mort est survenue dans 50% des cas rapportés dans la littérature (6/12).

Une étude française a démontré une séroprévalence pour la leptospirose significativement plus élevée chez des chats atteints d'un syndrome PU/PD comparativement à une population contrôle saine. Dans cette étude, 30% des chats séropositifs présentaient une PU/PD comparativement à seulement 4% des chats séronégatifs. [191] Malheureusement, les paramètres rénaux n'ont pas été évalués sur ces chats. Cette étude soulève tout de même la possibilité d'un rôle de la leptospirose dans les maladies rénales félines. De plus, certains auteurs croient que la leptospirose chronique peut être la cause de beaucoup de néphrites spontanées chez le chat. [140, 141, 194, 204, 205]

2.3.2 Examen post-mortem

Macroscopiquement, les reins et le foie présentent un aspect normal dans la majorité des cas cliniques rapportés. Des foyers hémorragiques ont été observés dans certains cas, au niveau des tissus conjonctifs et de la muqueuse intestinale [187] ou encore, des poumons et des méninges. [186] La présence d'hydrothorax [185, 186] et d'ascite a aussi été observée. [186] Finalement, un cas d'hydropéricarde accompagné d'œdème et de congestion pulmonaire a été rapporté. [185]

Des lésions semblables à celles décrites dans les études expérimentales ont été observées à l'examen histologique des tissus rénaux, soient une néphrite interstitielle [187, 203] et une nécrose épithéliale modérée des tubules rénaux (néphrite interstitielle modérée). [186, 187,

203] Une fibrose interstitielle variable et une infiltration lymphocytaire compatibles avec une néphrite tubulo-interstitielle ont été observées dans le plus récent rapport de cas clinique rapporté par la littérature. [185] Au niveau hépatique, une nécrose centro-lobulaire généralisée a été observée. Le même rapport de cas témoignant de lésions hémorragiques pulmonaires, a isolé des leptospires dans le liquide thoracique, l'humeur aqueuse et les reins du chat. [186]

2.4 État de porteur

Tenant compte du caractère zoonotique et des répercussions néfastes potentielles vis-à-vis de la santé humaine, la détermination de l'état porteur chez le chat demeure un élément très important. Le rôle du chat dans la transmission de la leptospirose reste à déterminer. [140] Le chat semble être peu sensible, mais l'excrétion urinaire a été mise en évidence expérimentalement pour les sérovars Grippotyphosa [188], Ballum, [200] Pomona, Australis et Canicola [190].

Certaines études ont démontré que l'excrétion urinaire des leptospires chez le chat peut se faire de façon intermittente jusqu'à 8 à 9 semaines post-inoculation. [69, 190, 198, 202] Le chat peut ainsi devenir une source d'infection potentielle pour l'humain.

Dans les infections expérimentales, l'isolation de leptospires à partir des reins de chats infectés après les avoir sacrifiés a été un échec. [190, 200, 202] Par contre, un PCR n'a pas été réalisé sur les échantillons puisque la culture était la seule méthode diagnostique directe possible à l'époque. De plus, l'acidité de l'urine du chat diminue la survie des leptospires chez cette espèce par rapport aux autres espèces. [140, 193, 198]

En se basant sur la littérature, il est évident que le rôle de *Leptospira spp.* comme agent étiologique de la maladie rénale féline demeure à préciser.

Chapitre 2: Hypothèses et objectifs

1 Hypothèses:

-La séroprévalence de leptospirose féline est élevée au Québec, surtout chez les chats ayant accès à l'extérieur et habitant en milieu rural.

-Le chat est porteur asymptomatique et peut excréter de façon intermittente des leptospires dans son urine, devenant ainsi une source d'infection potentielle pour son propriétaire.

-La séroprévalence et le statut porteur (PCR positif) de la leptospirose sont significativement plus élevés chez les chats atteints d'IRA ou de MRC.

-La leptospirose féline est sous-diagnostiquée par les vétérinaires, car elle est rarement considérée dans le diagnostic différentiel de maladie rénale.

2 Objectifs:

Le but principal de cette étude était de comparer la séroprévalence et le statut porteur (PCR positif sur urine) pour *Leptospira spp.* entre des chats sains et des chats atteints de maladie rénale au Québec.

Chapitre 3 : Étude prospective sur la leptospirose féline

1 Article : Détermination de la sensibilité et de la spécificité analytiques de la technique de PCR de *Leptospira interrogans* sur l'urine de chat ensemencée

Auteurs:

J. Rodriguez^a, M.-C. Blais^{a*}, D. Tremblay^b.

^aDépartement de sciences cliniques et ^bDépartement de Pathologie et Microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, J2S 2M2, Québec, Canada

Titre court: Leptospirose : validation du PCR sur l'urine de chats.

Mots clés: *Leptospira spp.*, PCR, chats

Abréviations: ADN : Acide désoxyribonucléique, PCR: Test de réaction de polymérisation en chaîne.

* Auteure de correspondance: Marie-Claude Blais, DMV, DACVIM, 1500 rue des vétérinaires, St-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 2M2

Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, J2S 2M2, Québec, Canada; Cette recherche a été subventionné par l'Association des Médecins Vétérinaires du Québec en pratique des petits animaux et par la donation généreuse de Mme. Valeria Rosenbloom and M. Mike Rosenbloom (Fond de santé des animaux de compagnie).

1.1 Résumé

Contexte: La sensibilité et la spécificité analytiques de la PCR de *Leptospira interrogans* sur l'urine de chat n'ont jamais été validées.

Objectives: Déterminer la sensibilité et la spécificité analytiques de la PCR de *Leptospira interrogans* sur l'urine de chatensemencée.

Matériels et méthodes: Deux pools d'urine prélevés par cystocentèse sur des chats en santé ont servi à la validation du PCR. L'urine a été contaminée par les différentes souches de leptospires non pathogènes et pathogènes et par d'autres bactéries. La sensibilité analytique de la PCR a été établie à l'aide de dilutions quantifiées des souches pathogènes. Pour déterminer la spécificité de la PCR, quatre des souches de leptospires non pathogènes et d'autres bactéries ont été utilisées (*E. coli* O111, *E. coli* O157, *S. aureus* et *B. burgdorferi*)

Résultats : Avec la technique de PCR utilisée, tous les aliquots d'urineensemencés avec des leptospires pathogènes se sont révélés positifs, et ce jusqu'à la limite de détection testée, soit jusqu'à une dilution maximale d'environ 8.3×10^2 leptospires/ml d'urine. De façon similaire, la technique de PCR a su mettre en évidence tous les échantillonsensemencés par des souches de leptospires pathogènes, et est demeurée négative pour les souches de leptospires non pathogènes et les autres bactéries.

Discussion : La validation in vitro de la sensibilité et de la spécificité analytiques a démontré que la technique de PCR du Laboratoire de Diagnostic Moléculaire de la FMV est efficace pour déterminer la présence de leptospires pathogènes dans l'urine du chat.

1.2 Introduction

Dans le cadre de cette étude, la sensibilité et la spécificité analytiques de la technique de la PCR de *Leptospira interrogans* sur l'urine de chat, telle qu'effectuée par le Laboratoire de Diagnostic Moléculaire de la Faculté de médecine vétérinaire (FMV), ont été déterminées. Bien que cette étape ait été validée préalablement chez le chien¹, elle ne l'avait jamais été chez le chat.

La technique de PCR permet la multiplication ou l'amplification exponentielle de l'ADN d'une région du chromosome particulier. Cette amplification permet d'obtenir suffisamment d'ADN bactérien pour son analyse.¹ Le seuil de détection est généralement de 10 à 100 leptospires / ml de sang ou d'urine.²⁻⁵ Une PCR positive révèle la présence de leptospires pathogènes dans l'échantillon, mais en aucun cas elle ne permet d'identifier directement le sérovar. Par contre, l'analyse des produits d'amplification par fusion des courbes⁶ par séquençage^{7,8} ou par électrophorèse permet de vérifier qu'un seul produit de PCR est amplifié. De cette façon, la PCR permet d'identifier les espèces impliquées et, dans certains cas, le sérovar ou génotype.

Plusieurs tests PCR ont été développés pour permettre de détecter les leptospires sur divers échantillons provenant d'animaux et d'humains, mais seuls quelques-uns ont été validés cliniquement.⁹⁻¹⁴ Le Laboratoire de Diagnostic Moléculaire de la FMV utilise une technique de PCR multiplex avec un ensemble d'amorces G1/G2 et B64I/B64II ayant déjà fait l'objet d'études.¹⁴⁻¹⁷ Ainsi, la méthode s'est révélée spécifique et sensible pour détecter les leptospires chez l'humain et le bovin. Le test a également été validé (validation analytique) sur l'urine de chien.¹² *Cai et al* ont d'ailleurs démontré que l'utilisation des amorces G1/G2 et B64I/B64II permet de diagnostiquer l'ensemble des leptospires pathogènes.¹²

¹ Communication personnelle avec Dre Josée Harel, données non publiées.

1.3 Matériel et Méthodes

1.3.1 Matériel

1.3.2 Amorces

Les amorces G1 (5'CTG AAT CGC TGT ATA AAA GT3'), et G2 (5'GGA AAA CAA ATG GTC GGA AG3') amplifient un fragment d'ADN de 285 paires de bases de l'ADN de 6 sérovars (Autumnalis, Bratislava, Canicola, Hardjo, Icterohaemorrhagiae et Pomona); tandis que les amorces B64-I (5'CTG AAT TCT CAT CTC AAC TC3'), et B64-II (5'GCA GAA ATC AGA TGG ACG AT3') amplifient un fragment d'ADN de 352 paires de bases de 2 sérovars (Sejroe et Grippytyphosa).

1.3.2.1 Souches bactériennes utilisées

Pour déterminer la sensibilité et spécificité analytiques de la technique de PCR utilisée dans le Laboratoire de Diagnostic Moléculaire de la FMV, des souches vivantes de leptospires provenant du « Leptospirosis Reference Center » aux Pays-Bas ont été importées en 2012 (Tableau VII), après avoir obtenu le permis d'importation de Santé Canada et de l'Agence canadienne d'inspection des aliments.

Les souches acquises avaient une dilution rapportée initiale de 5×10^8 leptospires/ml, bien que l'exactitude de la concentration bactérienne de départ n'ait pas été confirmée dans notre laboratoire.

Pour déterminer la spécificité analytique de la technique de PCR, des souches de leptospires non pathogènes et les bactéries suivantes, provenant du Laboratoire de microbiologie de la FMV de l'Université de Montréal, ont été également utilisées : *E. coli* O111, *E. coli* O157, *S. aureus*, *B. burgdorferi*.

1.3.2.2 Échantillons d'urine

Deux pools d'urine prélevés par cystocentèse sur des chats en santé ont servi à la validation du PCR. Le premier pool d'urine a été obtenu le 27 avril 2012 à partir de l'urine de 5 chats appartenant à la colonie de donneurs de sang du Centre hospitalier universitaire vétérinaire

(CHUV); un total de 50 ml a été récolté. Le deuxième pool d'urine a été obtenu le 2 mai 2012 à partir de 3 chats en santé appartenant aux membres du personnel de la clinique vétérinaire Johannaise²; un total de 45 ml a été récolté.

1.3.3 Méthodes

L'ADN a été isolé par une méthode d'extraction. Brièvement, l'extraction a eu lieu après une lyse de la membrane bactérienne réalisée à l'aide de chaleur. Après la lyse bactérienne, l'ADN a été purifié, puis a subi des réactions d'amplification enzymatique afin d'obtenir une quantité suffisante permettant son analyse. La présence d'un produit d'amplification a été facilement détectée avec la migration en gel d'agarose.

1.3.3.1 Sensibilité analytique

La sensibilité analytique de la technique de PCR a été établie à l'aide de dilutions quantifiées de 14 souches vivantes de leptospires (Tableau VII), incluant les six sérovars utilisés dans notre étude de séroprévalence, soient Pomona, Canicola, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Bratislava et Grippityphosa. De plus, la PCR a été effectuée aux jours 1, 3 et 6 sur de l'urine ensemencée conservée à 4°C pour une durée de six jours.

Étapes pour la validation de la sensibilité analytique

L'urine (5ml) a été mélangée avec 1 ml de culture de leptospires, pour ainsi obtenir une dilution bactérienne maximale de 8.3 leptospires $\times 10^7$ /ml d'urine. Plusieurs dilutions subséquentes ont été réalisées (10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2). La préparation et l'extraction d'ADN ont été réalisées sur chaque dilution d'urine ensemencée. Une fois le mélange de PCR pour une réaction préparé (50 microlitres), la migration sur gel, puis la lecture des résultats a eu lieu.

Pour valider la sensibilité analytique selon le temps d'entreposage, les échantillons d'urine ensemencés avec les diverses dilutions de leptospires ont été entreposés à 4°C. La technique de PCR a été répétée sur les échantillons d'urine entreposés aux jours 3 et 6.

² 354 Rue Philippe. Saint-Jean sur Richelieu. Québec.

1.3.3.2 Spécificité analytique

La spécificité analytique de la PCR a été déterminée à l'aide d'urine de chatensemencée par l'ensemble des souches de *Leptospira* pathogènes (12 souches) et non pathogènes (2 souches), et d'*E. coli*, de *S. aureus*, et de *B. burgdorferi*.

Étapes pour la validation de la spécificité analytique

La préparation et l'extraction d'ADN ont été effectuées pour chaque bactérie (*E. Coli* (0111, 0157, *S. aureus*, *B. burgdorferi*, *Leptospira* non pathogènes et *Leptospira* pathogènes).

Une fois le mélange de PCR pour une réaction préparé (50 microlitres), la migration sur gel, puis la lecture des résultats a eu lieu. La procédure a été répétée pour chaque bactérie.

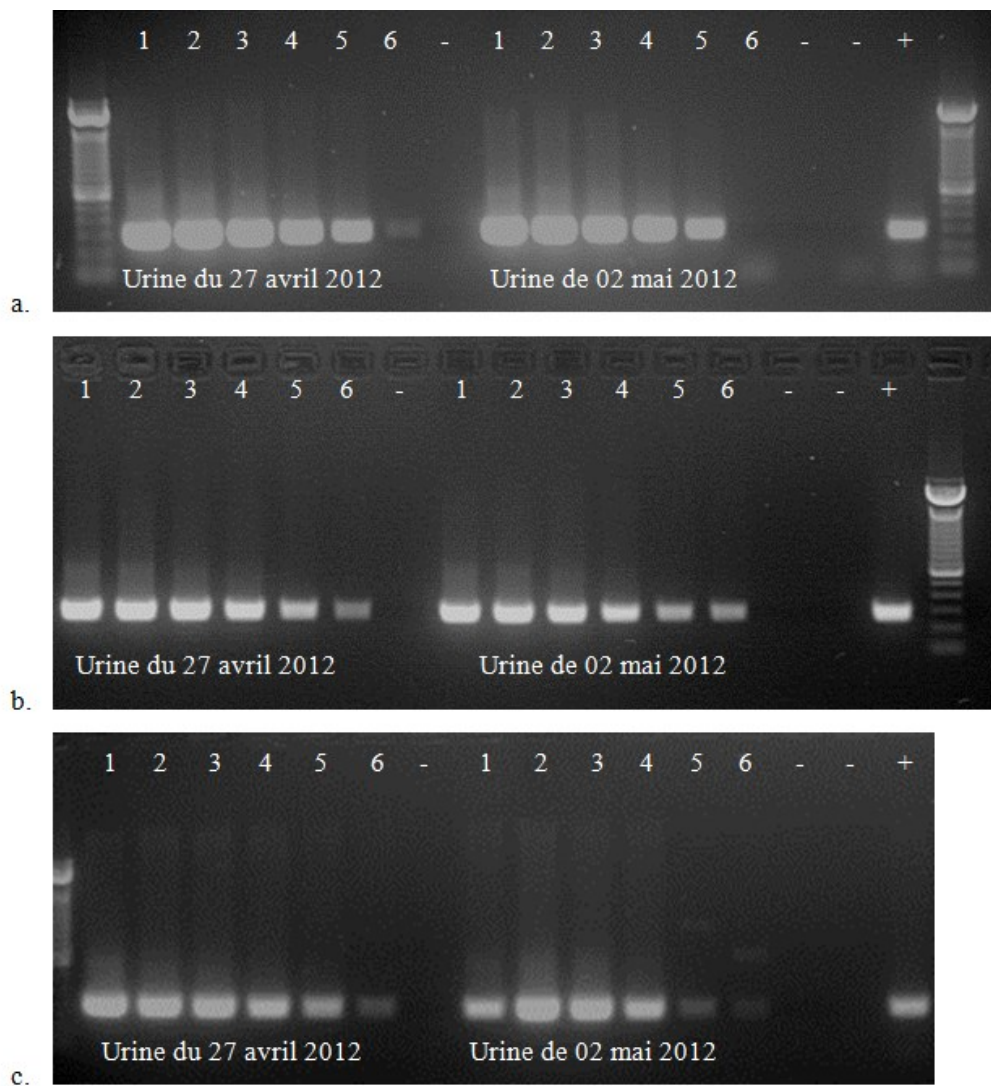
1.4 Résultats

Une analyse urinaire a été effectuée sur chacun des pools d'urine. Les densités urinaires étaient de 1,042 et 1.055, avec un ph urinaire de 6 dans les deux cas. Le reste des analyses urinaires était dans les limites de la normale pour les deux pools (i.e. absence de sang, cristaux, protéines et bactéries).

1.4.1 Sensibilité

Tous les PCR se sont avérés positifs jusqu'à la limite de détection testée, soit jusqu'à une dilution maximale d'environ 8.3×10^2 leptospires/ml d'urine et ce, même après 6 jours d'entreposage (Figure 1).

Figure 1. Résultats de PCR évaluant la sensibilité analytique



a. Jour 1(9mai 2012) b. Jour 3 (11 mai 2012) c. Jour 6 (14 mai 2012) Bande1-6 : Dilutions. Bande - : contrôle négatif, Bande + : contrôle positif. À noter : Le tube #5 d'urine provenant du pool d'urine collecté le 2 mai 2012 et testé le jour 6 a été échappé pendant l'extraction. Un quart du volume a été perdu, ce qui explique l'amplification plus faible.

1.4.2 Spécificité analytique

Une bande a été détectée pour toutes les souches de leptospires pathogènes testées, et aucune bande n'a été détectée pour les souches de leptospires non pathogènes et les souches de *E. Coli*, *S. aureus*, et *B. burgdorferi*. Ainsi, la PCR ne détecte que les souches de leptospires pathogènes. (Figure 2)

Figure 2. Résultats de PCR évaluant la spécificité analytique



Tous les résultats sont positifs, sauf les souches #1 et #4, et #16, #17 et #18, qui correspondent à des leptospires non pathogènes ou d'autres bactéries, respectivement. Bande - : contrôle négatif, Bande + : contrôle positif. Souches testées : (Bande 1-18) 1. *L. biflexa* /Semaranga /Patoc /Patoc. 2. *L. interrogans* /Icterohaemorrhagiae /copenhageni /M20. 3. *L. kmetyi* /Tarassovi /Malaysia /Bejo-Iso9. 4. *L. meyeri* /Ranarum /Ranarum /ICF. 5. *L. kirschneri* /Grippotyphosa /Grippotyphosa type Moska /Moska V. 6. *L. interrogans* /Pomona /Pomona /Pomona. 7. *L. interrogans* /Australis /Bratislava /Jez Bratislava. 8. *L. interrogans* /Icterohaemorrhagiae/Icterohaemorrhagiae/RGA. 9. *L. borgpetersenii* /Seijroe /Hardjo type bovis / Sponselee. 10. *L. Interrogans* / Seijroe /Hardjo type Prajitno /Hardjoprajitno. 11. *L. interrogans* / Canicola /Canicola /Hond Utrecht. 12. *L. interrogans* / Icterohaemorrhagiae /Lai /Lai. 13. *L. Borgpetersenii* / Tarassovi /Tarassovi /Perepelitsin. 14. *L. interrogans* / Autumnalis /Autumnalis /Akiyami. 15. *S. aureus*. 16. *E. coli* O111. 17. *E.coli* O157. 18. *B. burgdorferi*.

1.5 Discussion

Dans cette étude *in vitro*, la technique de PCR a démontré une limite de détection $<8.3 \times 10^2$ leptospires/ml d'urine; de plus, seuls les leptospires pathogènes ont été détectés. Les publications utilisant les mêmes amorces parlent d'une sensibilité analytique de 10^2 leptospires /ml d'urine.^{12,14} De façon similaire, une étude réalisée sur des bovins a révélé une spécificité de 100% en comparaison avec la culture pour une technique de PCR utilisant les mêmes amorces.¹⁶ En d'autres mots, toutes les souches pathogènes de leptospires ont été détectées, mais la PCR est demeurée négative pour l'ensemble des souches non pathogènes et pour les autres bactéries testées.

Diverses raisons expliquent le choix des bactéries utilisées dans le protocole de spécificité. D'une part, *E. coli* est de loin la bactérie la plus courante isolée lors d'infection du tractus urinaire, de maladie rénale chronique et de pyélonéphrite.¹⁸⁻²² Il est donc essentiel de s'assurer qu'elle n'interfère pas avec la technique PCR employée dans le cadre de notre étude principale traitant du statut sérologique et de porteur (PCR urinaire) de *Leptospira spp.* entre des chats sains et des chats atteints de maladie rénale. D'autre part, *B. burgdorferi* a été sélectionnée en raison de sa similitude morphologique avec les leptospires.

Bien que cette validation du PCR demeure une étude *in vitro*, elle démontre que la PCR effectué dans le Laboratoire de Diagnostic Moléculaire de la FMV est précis pour détecter le matériel génétique des leptospires dans l'urine acide des carnivores. En effet, l'acidité naturelle de l'urine des carnivores dans les conditions usuelles peut produire une inactivation rapide des leptospires; ce qui peut rendre difficile la mise en évidence des leptospires par d'autres tests usuels comme la culture.²³ Une étude de sensibilité effectuée sur 79 patients positifs pour la leptospirose a démontré que la technique de PCR utilisant les amorces G1/G2 et B64-I/B64-II est plus sensible par rapport à la culture, soit de 50% versus 35%.¹⁵ Une autre étude rapportant 71 patients positifs pour la leptospirose a démontré une sensibilité de 62% pour la PCR comparativement à 48 % pour la culture dans des échantillons de sérum, et de 50% versus 35 % respectivement dans des échantillons d'urine.¹⁴ Par contre, la technique de PCR dite classique est jugée moins sensible et moins spécifique que la PCR en temps réel; une

étude récente a démontré des sensibilité et spécificité pour la PCR en temps réel, comparativement à la culture, qui fluctuent entre 96.4% et 99.5%, respectivement.²⁴

Le principal avantage du test de PCR par rapport à la sérologie, mis à part l'obtention des résultats dans la phase aigüe de la maladie,²⁵ est la capacité d'identifier les porteurs chroniques.²⁶ Par contre, un PCR urinaire négatif n'élimine pas la possibilité que l'animal soit un porteur rénal chronique. Ce résultat négatif peut simplement être dû à l'excrétion urinaire d'un nombre insuffisant de leptospires pour en permettre la détection,²⁷ ou encore à une excrétion intermittente, laquelle a été déjà documentée chez le chien.^{26,28}

Limites :

Cette validation comporte une limite majeure, puisque la concentration de leptospires n'a pas été quantifiée dans notre laboratoire par un comptage bactérien en parallèle à la PCR. Une approximation a été faite en tenant en compte la dilution initiale rapportée de 5×10^8 leptospires/ml.

1.6 Conclusion

En conclusion, la validation in vitro de la sensibilité et de la spécificité analytiques a démontré que la PCR du Laboratoire de Diagnostic Moléculaire de la FMV est efficace pour déterminer la présence de leptospires pathogènes dans l'urine du chat. Les résultats nous ont permis de compléter notre étude principale sur la séroprévalence et l'excrétion urinaire de *Leptospira spp.* chez le chat au Québec.

1.7 Références

1. Denis F, Ploy M, Martin C, et al. Bacteriologie medicale Masson; 2007.
2. Smythe LD, Smith IL, Smith GA, et al. A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. BMC Infect Dis 2002;2:13.
3. Stoddard RA, Gee JE, Wilkins PP, et al. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. Diagn Microbiol Infect Dis 2009;64:247-255.
4. Bourhy P, Bremont S, Zinini F, et al. Comparison of real-time PCR assays for detection of pathogenic *Leptospira* spp. in blood and identification of variations in target sequences. J Clin Microbiol 2011;49:2154-2160.
5. Slack AT, Symonds ML, Dohnt MF, et al. Identification of pathogenic *Leptospira* species by conventional or real-time PCR and sequencing of the DNA gyrase subunit B encoding gene. BMC Microbiol 2006;6:95.
6. Merien F, Portnoi D, Bourhy P, et al. A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. FEMS Microbiol Lett 2005;249:139-147.
7. Perez J, Goarant C. Rapid *Leptospira* identification by direct sequencing of the diagnostic PCR products in New Caledonia. BMC Microbiol 2010;10:325.
8. Cerqueira GM, McBride AJ, Hartskeerl RA, et al. Bioinformatics describes novel Loci for high resolution discrimination of leptospira isolates. PLoS One 2010;5:e15335.
9. Ahmed A, Engelberts MF, Boer KR, et al. Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic leptospira species in clinical materials. PLoS One 2009;4:e7093.
10. Villumsen S, Pedersen R, Borre MB, et al. Novel TaqMan(R) PCR for detection of *Leptospira* species in urine and blood: pit-falls of in silico validation. J Microbiol Methods 2012;91:184-190.
11. Thaipadungpanit J, Chierakul W, Wuthiekanun V, et al. Diagnostic accuracy of real-time PCR assays targeting 16S rRNA and lipL32 genes for human leptospirosis in Thailand: a case-control study. PLoS One 2011;6:e16236.
12. Cai HY, Hornby G, Key DW, et al. Preliminary study on differentiation of *Leptospira grippityphosa* and *Leptospira sejroe* from other common pathogenic leptospiral serovars in canine urine by polymerase chain reaction assay. J Vet Diagn Invest 2002;14:164-168.

13. Merien F, Baranton G, Perolat P. Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. *J Infect Dis* 1995;172:281-285.
14. Brown PD, Gravekamp C, Carrington DG, et al. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. *J Med Microbiol* 1995;43:110-114.
15. Gravekamp C, Van de Kemp H, Franzen M, et al. Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. *J Gen Microbiol* 1993;139:1691-1700.
16. Wagenaar J, Zuerner RL, Alt D, et al. Comparison of polymerase chain reaction assays with bacteriologic culture, immunofluorescence, and nucleic acid hybridization for detection of *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo in urine of cattle. *Am J Vet Res* 2000;61:316-320.
17. Bal AE, Gravekamp C, Hartskeerl RA, et al. Detection of leptospires in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol* 1994;32:1894-1898.
18. White JD, Stevenson M, Malik R, et al. Urinary tract infections in cats with chronic kidney disease. *J Feline Med Surg* 2012.
19. Litster A, Moss S, Platell J, et al. Occult bacterial lower urinary tract infections in cats-urinalysis and culture findings. *Vet Microbiol* 2009;136:130-134.
20. Litster A, Moss SM, Honnery M, et al. Prevalence of bacterial species in cats with clinical signs of lower urinary tract disease: recognition of *Staphylococcus felis* as a possible feline urinary tract pathogen. *Vet Microbiol* 2007;121:182-188.
21. Eggertsdottir AV, Saevik BK, Halvorsen I, et al. Occurrence of occult bacteriuria in healthy cats. *J Feline Med Surg* 2011;13:800-803.
22. Hugonnard M, Chalvet-Monfray K, Dernis J, et al. Occurrence of bacteriuria in 18 catheterised cats with obstructive lower urinary tract disease: a pilot study. *J Feline Med Surg* 2013.
23. Andre-Fontaine G. Transmission de la leptospirose à l'homme. *Le nouveau praticien vétérinaire* 2004;210.
24. Slack A, Symonds M, Dohnt M, et al. Evaluation of a modified Taqman assay detecting pathogenic *Leptospira* spp. against culture and *Leptospira*-specific IgM enzyme-linked immunosorbent assay in a clinical environment. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007;57:361-366.
25. Harkin KR, Roshto YM, Sullivan JT. Clinical application of a polymerase chain reaction assay for diagnosis of leptospirosis in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2003;222:1224-1229.

26. Rojas P, Monahan AM, Schuller S, et al. Detection and quantification of leptospires in urine of dogs: a maintenance host for the zoonotic disease leptospirosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010;29:1305-1309.
27. Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:296-326.
28. Harkin KR, Roshto YM, Sullivan JT, et al. Comparison of polymerase chain reaction assay, bacteriologic culture, and serologic testing in assessment of prevalence of urinary shedding of leptospires in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2003;222:1230-1233.

1.8 Tableau

Tableau VII. Souches de leptospires non pathogènes et pathogènes utilisées pour la détermination de la sensibilité et/ou de la spécificité analytiques de la technique de PCR étudiée.

Leptospires non pathogènes	Leptospires pathogènes
<i>L. biflexa</i> (Patoc1)	<i>L. interrogans</i> (Pomona)
<i>L. meyeri</i> (Semaranga)	<i>L. interrogans</i> (Copenhageni)
	<i>L. interrogans</i> (Bratislava)
	<i>L. interrogans</i> (Icterohaemorrhagiae)
	<i>L. borgpetersenii</i> (Seijroe) type bovis et Prajitno
	<i>L. interrogans</i> (Canicola)
	<i>L. borgpetersenii</i> (Tarassovi)
	<i>L. interrogans</i> (Autumnalis)
	<i>L. kirschneri</i> (Grippotyphosa)
	<i>L. kmetyi</i> (Tarassovi)

2 Article: Feline leptospirosis: serologic and urinary PCR survey in healthy cats and in cats with kidney disease

Authors:

J. Rodriguez^a, M.-C. Blais^{a*}, C. Lapointe^a, J. Arsenault^b, L. Carioto^a, J. Harel^b.

^a Departments of Clinical Sciences and ^bDepartment of Pathology and Microbiology, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, J2S 2M2, Québec, Canada

Short title: Serologic and PCR Survey of Feline Leptospirosis

Key words: *Leptospira spp.*, Renal disease, MAT.

Abbreviations: A/G: albumin/globulin, AKI: acute kidney injury, ALT: alanine aminotransferase, AST: aspartate transaminase, CBC: complete blood count, CK: creatine kinase, CI: confidence intervals, CKD: chronic kidney disease, H: healthy, Hb: hemoglobin, KD: kidney disease, MAT: microscopic agglutination test, PCR: polymerase chain reaction, PU/PD: polyuria and polydipsia, SUN : serum urea nitrogen, USG: urine specific gravity, WBC: white blood cell

* Corresponding author. Marie-Claude Blais, DMV, DACVIM, 1500 rue des vétérinaires, St-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 2M2

Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, J2S 2M2, Québec, Canada; This research was supported by the Association des Médecins Vétérinaires du Québec en pratique des petits animaux and the generous donation from Mrs. Valeria Rosenbloom and Mr. Mike Rosenbloom (Fond de santé des animaux de compagnie).

2.1 Abstract

Background: Although serologic evidence of feline exposure to *Leptospira spp.* exists, clinical disease is rarely reported in cats.

Objective: To compare the seropositivity and urinary PCR status for *Leptospira spp.* between healthy (H) cats and cats with kidney disease (KD), to determine the serovars involved, and to evaluate potential risk factors.

Animals: The study included 240 cats.

Methods: Cats were classified based on physical examination, complete blood count, serum biochemistry profile and urinalysis (125 H and 115 KD cats). *Leptospira spp.* serology (titers $\geq 1:100$ considered positive) and urinary PCR were performed for all cats. Data assessing risk factors, obtained from a questionnaire, were evaluated using logistic regression models.

Results: The seropositivity for *Leptospira spp.* was statistically different between groups: 7.2% and 14.9% in the H and KD, respectively ($P = .05$); but the proportion of PCR positive cats was not. Based on antibody testing, the most common serovars involved were Pomona (n=16) and Bratislava (n=8). Identified risk factors for seropositivity included outdoor and hunting lifestyles ($P = .03$ and $P < .001$, respectively), the presence of another cat in the household ($P < .01$), and the sampling period ($P < .05$), with the greatest number of cases identified between June and August.

Conclusions: Seropositivity was significantly greater in KD cats, suggesting that the role of *Leptospira spp.* in feline KD may be underestimated. The detection of urinary shedding of leptospire in several cats highlights their potential role in disease transmission.

2.2 Introduction

Leptospirosis, which is caused by infection with pathogenic *Leptospira* species, is the most widespread zoonosis worldwide, and it has been found in almost all species of mammals examined.^{1,2} In cats, the seroprevalence varies from 4.8% to 35% depending on the geographical location and the diagnostic methods used.³⁻¹³ Although serologic evidence of feline exposure exists, clinical disease is rarely reported and little information is known about leptospirosis in cats and its clinical significance. Experimental studies have proven that cats can shed leptospires in their urine intermittently for several weeks post-inoculation, thereby becoming a potential source of infection for humans.¹⁴⁻¹⁶

Kidney disease (KD) has a major impact on the health of cats.^{17,18} Although many cats with an outdoor lifestyle are in close contact with potential reservoir hosts for leptospirosis (mice and rats),¹⁹ the role of *Leptospira spp.* as an etiologic agent for feline KD has not been determined.^{6,19,20} Most experimental studies suggest that cats are resistant to acute leptospirosis,¹⁴⁻¹⁶ yet the description of some clinical cases proves that leptospires can be pathogenic to this species, causing mainly kidney²¹⁻²³ and liver damage.^{22,24} In addition, a serologic study conducted in France found a statistical relationship between cats presenting with polyuria and polydipsia (PU/PD) and seropositivity for *Leptospira spp.*⁶ In that study, 14/16 PU/PD cats were seropositive versus 32/80 without PU/PD. However, the long-term impact of infection on the renal function of cats is unknown as the longest experimental study lasted only 84 days.¹⁵

The aim of this study was to compare the seropositivity and the urinary PCR status for *Leptospira spp.* between healthy cats (H) and cats with KD (both acute kidney injury (AKI) and chronic KD),^{a,25} and to determine the serovars involved in Quebec, Canada. In addition, factors potentially influencing the seropositivity and PCR status for *Leptospira spp.* were evaluated, e.g. age, sex, outdoor access, multipet households, a rural versus urban environment, contact with wildlife, and seasonality of sampling. Finally, among KD cats, several parameters were evaluated for their potential influence on the seropositivity and/or PCR status, including pertinent hematology, serum biochemistry and urinalysis parameters and the type of KD (i.e. AKI versus CKD of various stages).

2.3 Materials and Methods

2.3.1 Case selection criteria

The study was approved by the Université de Montréal Animal Care and Use Committee based on the Institutional Ethics Committee Guidelines provided by the Canadian Council on Animal Care. Healthy cats and cats with KD of unknown etiology were recruited from January 2010 to March 2012 from the client population of the Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire of the Université de Montréal, and from three local private veterinary clinics^b, until the calculated sample size was attained for each group. Final classification between the H and KD groups was based on physical examination by a veterinarian, complete blood count (CBC), serum biochemistry profile and urinalysis results. Only azotemic cats with a urinary specific gravity < 1.035, with or without clinical signs, were assigned to the KD group, i.e. AKI or CKD and sub-categories (CKD stage IIb, III or IV). Therefore, some cats initially thought to be healthy were re-classified in the KD group. Cats suffering from KD of a known etiology (eg.: exposure to a nephrotoxin, urinary tract obstructions, ureterolithiases, neoplasia, etc.) were excluded from the study. Similarly, breeds with a high risk of congenital KD (eg: polycystic kidney disease (PKD) in Persian, Exotic, Himalayan and Oriental cats, and renal amyloidosis in the Abyssinian, Somali, Siamese and certain Oriental breeds) were excluded unless a renal ultrasound (PKD) or a DNA test had been performed to exclude these diseases. Finally, cats having received antibiotics in the three months prior to the study were excluded.

Following signed informed owner consent, a physical examination was performed, and blood (5 ml) and urine (5 ml via cystocentesis) were collected for analysis. Other pertinent information, such as home address, age, sex, outdoor access with or without likely contact with wildlife, rural versus urban environment and the presence of other pets in the household were obtained by means of a questionnaire. The date of sample collection was recorded.

2.3.2 Sample size determination

Based on results obtained in a preliminary survey¹³ and previously published data⁶, the sample size by group (H, KD) was estimated on the basis of an assumed prevalence of positive MAT of 25% and 48% per group, respectively. Sample sizes were calculated for seroprevalence estimation in each group (95% confidence level, 10% precision) and for comparison of seroprevalence between groups (95% confidence level, 80% power). For both groups, the largest sample size estimated was used, resulting in

a minimum of 96 cats per group. Additional cats were recruited to offset the group change of several cats (H versus KD) once the blood work and urinalysis results were available.

2.3.3 Procedures

CBC, serum biochemistry profile and urinalysis:

A CBC, serum biochemistry profile and urinalysis were performed on every cat enrolled in the study.

Microscopic agglutination test (MAT)

The MAT were performed by the Quebec government veterinary diagnostic laboratory (LEPAQ)^ε. The serum samples were frozen and sent once a month for analysis. The samples were tested for specific antibodies against *Leptospira interrogans* serovars Pomona, Canicola, Hardjo, Icterohaemorrhagiae and Bratislava, and for *L. kirshneri* serovar Grippityphosa. Titers $\geq 1:100$ were considered positive. In seropositive cats, the serovar with the highest titer was identified.

Polymerase chain reaction assay (PCR) for *Leptospira* spp.

One to two ml of urine collected by cystocentesis was used to perform PCR in all cats. The urine samples were refrigerated and processed within 72 hours of collection by the Laboratoire de Biologie Moléculaire of the Université de Montréal, using G1 and G2 and B64-I/B64-II primers, which can amplify a 285-bp DNA fragment from *L.interrogans* serovars Pomona, Canicola, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Automnalis and Bratislava, and a 352-bp fragment from the DNA of *L.interrogans* serovar Sejroe and *L.kirshneri* serovar Grippityphosa, respectively, as previously described.^{26,27} A positive result was considered to reflect urine shedding.²⁸

2.3.4 Statistical Analysis

Prevalence estimation

For both laboratory assays (MAT, PCR), the prevalence of positive cats with 95% confidence intervals (CI) was estimated separately for H and KD groups. The CI were adjusted for the clustered sampling design, i.e. accounting for cats living in the same household. The Surveyfreq procedure of SAS version 9.3 was used for estimation.

Risk factor analyses

All potential risk factors collected by means of a questionnaire and geographical analyses were categorized and are presented in Table i. For the geographical analyses, the home address of each cat owner was converted into geographical coordinates using the GeoPinpoint software version 2011.3 (DMTI Spatial) and then manually validated. The population density within an 80 meter radius of the cat's home, which represents the standard roaming territory of cats²⁹, was estimated using data from Statistics Canada 2011 census^d. The Euclidean distance between the cat's home and the nearest farm was estimated for swine, bovine (dairy and/or beef cattle) and small ruminants (sheep and/or goat). The centroid of the farm lot where animals were housed was used for the calculation, based on 2007 data obtained from the MAPAQ^e. This database was updated voluntarily by farmers until 2010 (e.g. newly registered enterprises, farming cessation, change in production type). All spatial analyses were done in ArcInfo version 9.3 (ESRI Inc.).

Generalized estimating equations (GEE) logistic regression was used for modeling. An exchangeable correlation structure was used in the model to account for a possible correlation in the predicted outcomes among cats residing in the same house. Investigated outcomes were the MAT status (positive vs. negative) and PCR status (positive vs. negative). Potential risk factors were first tested individually in a model including the intercept and the group (H vs. KD). Variables with a *P-Value* $\leq .25$ (Wald test for the overall significance of the variable) were considered for inclusion in a full model. In the presence of co-linear variables based on biological knowledge and data exploration, only the one with the smallest *P-Value* was selected. A backward procedure was then used for final model selection, with $P > .05$ as criterion for rejection. Alternative models were explored by considering other variables previously rejected for co-linearity issues. Odds ratios with 95% confidence intervals and predicted probabilities were used to present the results. Analyses were performed using the Genmod procedure of SAS version 9.3.

Associations with indicators of disease severity

For the KD group, selected hematology, serum biochemistry and urinalysis variables (i.e. PCV, platelet count, hepatic enzyme activities (ALP, ALT, GGT) and total bilirubin concentration, as well as urine specific gravity, presence of proteinuria and glucosuria and their respective concentrations) were compared between the seropositive and seronegative cats using the Wilcoxon test. The association between KD types (AKI vs. CKD) or CKD IRIS stages, and MAT or PCR status was tested using the exact Chi-square test. Analyses were performed in SAS version 9.3.

2.4 Results

A total of 251 cats were recruited, 11 of which were excluded for one of the following reasons: receiving or having received antibiotics in the previous three months (n=9), presence of a urinary tract infection in one H cat and diagnosis of obstructive nephrolithiasis in one KD cat. Therefore, 240 cats belonging to 194 families (mean value of 1.24 cats per family; range of 1-10 cats) were enrolled in the study: 125 H cats and 115 cats with either AKI (n=19; 16.5%) or CKD (n=96; 83.5%). Three KD cats were excluded from part of the statistical analysis because of missing results for MAT (n=1) or PCR (n=2). The mean age of the H and KD groups was 8.8 and 11.6 years old, respectively. For analysis purposes, the cats were divided into three age-groups: ≤ 5 years old (H= 10 cats; KD= 13 cats), 6 to 10 years old (H= 83 cats; KD= 32 cats) and > 10 years old (H= 32 cats; KD= 70 cats). The CBC, serum biochemistry profile and urinalysis results are summarized in Table ii and iii for each group.

Overall, 26 cats were seropositive and 8 were PCR positive. The seropositivity for *Leptospira* spp. was estimated at 7.2% (95% CI: 2.2-12.2) in the H group and 14.9% (95% CI; 8.3-21.6) in the KD group. The proportion of PCR positive cats was estimated at 1.6% and 5.3% in the H and KD cats, respectively.

When considering the highest *Leptospira* spp. titers 19,30-36, the serovars involved were *L. Pomona* (n=16), *L. Bratislava* (n=8) and *L. Grippotyphosa* (n=1), with median titers significantly higher for *L. Pomona* ($P = .04$). One cat had equivalent titers for *L. Bratislava* and *L. Grippotyphosa* (titers=100). Detailed serology results are presented in Table iv.

Characteristics tested for their association with the cats' serology and PCR status are described in Table i, in addition to the results of the GEE models for individually tested variables. According to these models, the seroprevalence was higher in the KD group compared to the H group ($P = .05$), but no difference was observed between groups for the PCR status ($P = .55$). It should be noted that the seroprevalence and PCR status did not vary significantly according to the age ($P = .35$ and $P = .33$, respectively) or sex ($P = .77$ and $P = .64$, respectively) of the cats. Among the variables selected for the multivariate analysis, the variables "other cat in the household" and "other pets in the household" were strongly correlated. Only the former was included in the multivariate model.

The final multivariate model predicting seropositivity is presented in Table v. Predicted seropositivity for *Leptospira* spp. remained statistically different between groups: 5% and 13.7% in the H and KD, respectively (odds ratio=2.8, $P = .02$). Known hunters had a predicted seroprevalence of 15.2%, compared to 4.5% in cats not considered hunters by their owner ($P < .01$). The presence of another cat

in the household significantly increased the risk of seropositivity for leptospirosis ($P < .01$), although the presence of a dog did not. Cats were more likely to be seropositive between the months of June to August compared to December to May ($P = .02$). A similar trend was found between the months of September to November compared to December to May, but did not reach statistical significance ($P = .06$). It should be noted that the variable “hunter” selected in this model was correlated with the variables “outdoor access”, “contact with wild rodents” and “contact with skunks”. Thus, three alternative multivariate models were developed while considering only one of the above variables at-a-time (results not shown). In all models, the variable was kept in the model if $P < .05$.

Due to the low number of PCR positive cats, no multivariate logistic regression model was developed. When evaluating the PCR status of cats in the GEE model for individually tested variables, only the variables “contact with raccoons” and “contact with skunks” were statistically significant ($P \leq .03$).

For the KD group, no significant difference was observed in the selected hematology, serum biochemistry and urinalysis variables, including liver enzyme activities, between the seropositive and seronegative cats (Wilcoxon test, $P \geq .47$). For this group only the total bilirubin was statistically significant, with higher bilirubin concentrations, which remained within reference range, found in the seronegative KD cats (Wilcoxon test, $P < .01$). The seroprevalence in cats with AKI was 21.1% (4/19) and with CKD was 13.7% (13/95), which were not statistically different (Exact Chi-square test, $P = .48$). Of the 96 CKD cats, 61 cats were classified in stage IIb (63.5%), 33 cats in stage III (34.4%) and 2 cats in stage IV (2.0%). The seroprevalence in cats with CKD did not vary statistically according to their IRIS stage (Exact Chi-square test, $P = .41$) and was as follows: 13.3% (8/60) for stage IIb, 12.1% (4/33) for stage III and 50% (1/2) for stage IV. The analysis was repeated with the type and stage of KD reclassified in three categories (AKI; CKD stage IIb; and CKD stage III/IV), which remained not associated with the seroprevalence (Exact Chi-square test, $P = .72$) or with the urinary PCR status (Exact Chi-square test, $P = .14$).

2.5 Discussion

In this study, the seropositivity for *Leptospira spp.* was significantly greater in KD cats (14.9% in 114) than in H cats (7.2% in 125). Also, although it did not reach statistical significance, a tendency was present for increased urinary shedding of leptospire in KD cats (5.3%, i.e. 6/113) compared with healthy cats (1.6%, i.e. 2/125). These findings suggest that leptospirosis may be an under-diagnosed cause of KD in cats, but the role of *Leptospira spp.* in the pathophysiology of feline KD remains to be elucidated. For instance, cats with kidney disease could simply be at increased risk of contracting leptospirosis compared to healthy cats.

The seroprevalences obtained in this study are similar to those reported in most other studies, i.e. from 4.8-16.9%.^{3-5,7,9-13} Only two studies reported seroprevalences greater than 30%,^{6,8} but a lower cut-off value was utilized, i.e. antibody titers of 1:50 and 1:80, respectively.

In this study, the seropositive cats often had extremely elevated titers, with seven out of 16 titers for Pomona reaching the maximal dilutions normally conducted by LEPAQ (1:6400 and 1:12800; Table iv). This finding differs from what is reported in the literature, including both experimental and epidemiological studies, as cats are thought to respond to infection with low antibody titers ranging from 1:30 to 1:400.^{3,4,7,8,10,12} To the best of our knowledge, less than five cats in the literature have been reported to have titers exceeding 1:3200.^{5,11,21,37} In addition to low serological response, cats are reported to rarely develop clinical leptospirosis.^{21,24,38} The very high titers identified in our study may reflect either a recent or active infection, or a reinfection, especially in outdoor cats. Monitoring all seropositive cats using paired titers would have helped better explain our results. It is possible that the high antibody titers corresponded to an efficient humoral response, which may explain why only 15% of seropositive cats were also PCR positive (Table iv). Anecdotally, we followed a 14 year old castrated male stage IIb CKD cat, which was both seropositive and PCR positive (initial titer for Pomona of 1:1600). The cat lived with a dog, which was tested MAT and PCR negative. Following 2 weeks of amoxicillin (22 mg/kg PO BID) and 3 weeks of doxycycline (5 mg/kg PO BID), the cat was PCR negative, but its antibody titers had increased to 1:3200, and remained at this titer 18 months later. This confirms previously reported human studies in which titers remained elevated for an extended period despite antibiotic treatment.³⁹⁻⁴¹

Based on antibody testing, the most common serovars involved were *L. Pomona* (n=16) and *L. Bratislava* (n=8; Table iv). This finding may reflect the importance of bovine and porcine livestock in the province of Quebec, which are known to be primary reservoirs of both serovars.⁴²⁻⁴⁶ Indeed, Quebec is responsible for 48% of the Canadian dairy production^g and is one of the largest pork exporters worldwide.^h However, the geographical analyses did not reveal any relationship between seropositive cases and the proximity of farms.

Similar to previous studies,^{16,31} outdoor cats, notably hunters, were more likely to be seropositive, probably due to their increased contact with potential reservoirs of the disease. In addition, wild animals including raccoons and skunks, were identified as risk factors in PCR positive cats ($P \leq .03$). The former are also known maintenance hosts of the serovars *L. Pomona* and *L. Bratislava* and may indirectly infect cats.⁴⁷⁻⁵¹ In fact, the population of raccoons in Quebec is massive, particularly in the Montérégie region⁵² where most of the cats were recruited, and raccoons are known carriers of *L. Pomona* and *L. Bratislava*.^{48-50,53} Moreover, a recent serosurvey conducted by the MAPAQ^e in the area revealed a 56.1% seroprevalence of *Leptospira spp.* in 107 raccoons and 25% in 112 striped skunks, with the *L. interrogans* serovars Pomona, Bratislava and Grippotyphosa implicated most frequently.⁵⁴

Interestingly, in our study the presence of another cat in the household significantly increased the risk of seropositivity for leptospirosis, although the presence of a dog did not. Sharing a litter box was not evaluated as a risk factor on its own, but may be of concern in the perpetuation of the infection.

Based on meteorological risk factors previously described,^{55,56} the following three periods of the year were used for analysis: June to August, September to November, and December to May. The seroprevalence was statistically greater between June to August compared with December to May. The period between June and August corresponds to the warmest and most humid months of the year in Quebec. This permits the persistence of *Leptospira spp.* in the environment.^{i,56-59}

The risk factors identified in this study, such as an outdoor and hunting lifestyles, the likely contact with raccoons and/or skunks, the presence of another cat in the household and warm and humid weather, should prompt veterinarians to test for *Leptospira spp.* in cats with either AKI or CKD.

The excretory status was confirmed by a positive urine PCR in eight cats, mainly in the KD group, but also in two healthy cats. Similarly to the chronic carrier state suggested in some healthy dogs,⁶⁰ the PCR positive healthy cats identified in our study suggest that cats may be asymptomatic hosts, thereby

excreting leptospire in their urine and becoming a potential source of infection for both the owners and the environment. While this finding raises obvious public health concerns, two studies have demonstrated the protective role of cat ownership in reducing the risk of infection in their owners, likely because of the scavenging role of cats for rodents, which are considered the main reservoir for humans.^{51,61}

Limitations:

Limiting our study to six serovars may have resulted in some false negative serologic results,²⁰ although the seroprevalence in this study is similar, if not slightly greater than that in other studies reporting seroprevalence rates of 4.8-12.8%.^{3,5,11} Moreover, our study included the four most commonly diagnosed *Leptospira* serovars in domestic animals in Quebec, which are *L. Pomona*, *L. Hardjo*, *L. Bratislava* and *L. Grippotyphosa*.⁵³

Recent studies suggest that the MAT does not accurately predict the infective serovar. This in turn limits our ability to infer the most likely source of infection amongst previously reported reservoirs based on the identification of a common serovar. In a human clinical study, the serovar with the highest titer was the infective serovar in only 46% of cases.⁶² A study in vaccinated dogs and dogs infected with leptospirosis also found considerable inter-laboratory variation in MAT results.⁶³ Molecular typing techniques, such as real-time PCR, would have been useful in identifying the causative serovars in our study.^{27,28,64-67}

Although the prevalence of PCR positive cats was higher in the KD group (5.3%; 6/113) compared to the H group (1.6%; 2/125), the difference between groups did not reach statistical significance. This is possibly due to the limited number of cats included in the study, which had been based on the preliminary serologic data, as no PCR study had previously been conducted in North American cats. Simultaneous PCR testing of blood and urine would have likely increased the diagnostic sensitivity.²⁰ In addition, a negative PCR result does not exclude the possibility of intermittent excretion,^{28,68} notably in seropositive cats. Repeated MAT and PCR testing, particularly of seropositive cats, could have helped shed light on this matter, but was not performed due to both limited finances and access to the cats.

We initially intended to have age-matched groups, but were unable to do so because several presumably H cats had to be re-classified in the KD group once the urinalysis and blood work results were available. This was not surprising since CKD is a common disease in cats.⁶⁹ For instance, a prospective study conducted in initially healthy geriatric cats (≥ 9 years old; median of 13 years) revealed that a third of them (29/95) developed azotemia within the following year of enrollment.¹⁷

2.6 Conclusion

Although the precise role of *Leptospira spp.* as an etiologic agent of feline KD remains unclear, the significant difference found in the serologic status between H and KD cats suggests that leptospirosis may be an under-diagnosed cause of feline AKI or CKD. Based on the results of this study, veterinarians should include leptospirosis in their list of differential diagnoses of feline KD, notably if risk factors are present, such as an outdoor lifestyle, particularly if the cat is a known hunter, or is likely to have contact with wild animals, if another cat is present in the household, and/or there is a corresponding seasonality. Two asymptomatic carriers and several healthy cats with very high titers were identified in this study, therefore, the role of cats in the transmission of leptospirosis should be reevaluated, as it may in fact be underestimated.

2.7 Footnotes

^aInternational Renal Interest Society (IRIS). <http://iris-kidney.com/>

^b Clinics and the hospital included in the study located in the Montérégie area of Québec, Canada : Hôpital vétérinaire Rive-Sud, Brossard. Clinique vétérinaire Johannaise, St-Jean-sur-Richelieu. Clinique vétérinaire Marieville, Marieville.

^cLaboratoire d'Expertise en Pathologie Animale du Québec (LEPAQ) of the Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ).

^d2011 Canadian population census Statistics Canada (www.statcan.gc.ca)

^eMinistère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ)

^fData extracted from the MAPAQ May 2012 database on registered agricultural farms

^gAnnual Report, 2010, Fédération des producteurs de lait du Québec. <http://www.lait.org>. Dépôt légal : 2010. Bibliothèque et archives nationales du Québec, 2011. ISSN 0841-4041.

^hMonographie de l'industrie porcine au Québec. MAPAQ. Dépôt légal : 2010. Bibliothèque et archives nationales du Québec, 2011. ISBN 978-2-550-59142-9.

ⁱNational climate data and information archive. <http://www.climate.weatheroffice.gc.ca>

^jClimat-Québec. <http://www.climat-quebec.qc.ca/index.php>

2.8 References

1. Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:296-326.
2. Ko AI, Goarant C, Picardeau M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol* 2009;7:736-747.
3. Agunloye CA, Nash AS. Investigation of possible leptospiral infection in cats in Scotland. *J Small Anim Pract* 1996;37:126-129.
4. Dickeson D, Love DN. A serological survey of dogs, cats and horses in south-eastern Australia for leptospiral antibodies. *Aust Vet J* 1993;70:389-390.
5. Larsson CE, Santa Rosa CA, Hagiwara MK, et al. Prevalence of feline leptospirosis: serologic survey and attempts of isolation and demonstration of the agent. *Int J Zoonoses* 1984;11:161-169.
6. Luciani O. Réceptivité et sensibilité du chat aux leptospires. In. France: École Nationale Vétérinaire de Nantes.; 2004.
7. Millan J, Candela MG, Lopez-Bao JV, et al. Leptospirosis in wild and domestic carnivores in natural areas in Andalusia, Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2009;9:549-554.
8. Mylonakis ME, Bourtzi-Hatzopoulou E, Koutinas AF, et al. Leptospiral seroepidemiology in a feline hospital population in Greece. *Vet Rec* 2005;156:615-616.
9. Everard CO, Cazabon EP, Dreesen DW, et al. Leptospirosis in dogs and cats on the Island of Trinidad: West Indies. *Int J Zoonoses* 1979;6:33-40.
10. Lucke VM, Crowther ST. The Incidence of Leptospiral Agglutination Titres in the Domestic Cat. *Vet Rec* 1965;77:647-648.
11. Markovich JE, Ross L, McCobb E. The prevalence of leptospiral antibodies in free roaming cats in Worcester County, Massachusetts. *J Vet Intern Med* 2012;26:688-689.
12. Shophet R. A serological survey of leptospirosis in cats. *N Z Vet J* 1979;27:236, 245-236.
13. Lapointe C, Plamondon I, Dunn M. Feline leptospirosis serosurvey from a Québec referral hospital. *Can Vet J* 2013;54:497-499.

14. Fessler JF, Morter RL. Experimental feline leptospirosis. *Cornell Vet* 1964;54:176-190.
15. Larsson CE, Santa Rosa CA, Larsson MH, et al. Laboratory and clinical features of experimental feline leptospirosis. *Int J Zoonoses* 1985;12:111-119.
16. Shophet R, Marshall RB. An experimentally induced predator chain transmission of *Leptospira ballum* from mice to cats. *Br Vet J* 1980;136:265-270.
17. Jepson RE, Brodbelt D, Vallance C, et al. Evaluation of predictors of the development of azotemia in cats. *J Vet Intern Med* 2009;23:806-813.
18. Lulich JP, Osborne CA, O'Brien TD, et al. Feline renal failure: questions, answers, questions. *The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 1992;14:127-152.
19. Andre-Fontaine G. Canine leptospirosis--do we have a problem? *Vet Microbiol* 2006;117:19-24.
20. Sykes JE, Hartmann K, Lunn KF, et al. 2010 ACVIM small animal consensus statement on leptospirosis: diagnosis, epidemiology, treatment, and prevention. *J Vet Intern Med* 2011;25:1-13.
21. Arbour J, Blais MC, Carioto L, et al. Clinical leptospirosis in three cats (2001-2009). *J Am Anim Hosp Assoc* 2012;48:256-260.
22. Bryson DG, Ellis WA. Leptospirosis in a British domestic cat. *J Small Anim Pract* 1976;17:459-465.
23. Hemsley L. *Leptospira canicola* and chronic nephritis in cats. *Vet Rec* 1956;68:300.
24. Mason RW, King SJ, McLachlan NM. Suspected leptospirosis in two cats. *Aust Vet J* 1972;48:622-623.
25. Polzin DJ and ES, Feldman EC. In: *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, 6 ed 2005:1756-1752. .
26. Cai HY, Hornby G, Key DW, et al. Preliminary study on differentiation of *Leptospira grippityphosa* and *Leptospira sejroe* from other common pathogenic leptospiral serovars in canine urine by polymerase chain reaction assay. *J Vet Diagn Invest* 2002;14:164-168.
27. Palaniappan RU, Chang YF, Chang CF, et al. Evaluation of lig-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospires. *Mol Cell Probes* 2005;19:111-117.

28. Rojas P, Monahan AM, Schuller S, et al. Detection and quantification of leptospire in urine of dogs: a maintenance host for the zoonotic disease leptospirosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010;29:1305-1309.
29. Horn JA, Mateus-Pinilla N, Warner R, et al. Home Range, Habitat Use, and Activity Patterns of Free-Roaming Domestic Cats. *The Journal of Wildlife Management* 2011;75:1177-1185.
30. Greene CE. Diagnosis, therapy, and prevention of common infectious diseases in the dog. *Vet Q* 1994;16 Suppl 1:2S-5S.
31. Bolin CA. Diagnosis of leptospirosis: a reemerging disease of companion animals. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 1996;11:166-171.
32. Langston CE, Heuter KJ. Leptospirosis. A re-emerging zoonotic disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2003;33:791-807.
33. Mastrorilli C, Dondi F, Agnoli C, et al. Clinicopathologic features and outcome predictors of *Leptospira interrogans Australis* serogroup infection in dogs: a retrospective study of 20 cases (2001-2004). *J Vet Intern Med* 2007;21:3-10.
34. Ghneim GS, Viers JH, Chomel BB, et al. Use of a case-control study and geographic information systems to determine environmental and demographic risk factors for canine leptospirosis. *Vet Res* 2007;38:37-50.
35. Goldstein RE, Lin RC, Langston CE, et al. Influence of infecting serogroup on clinical features of leptospirosis in dogs. *J Vet Intern Med* 2006;20:489-494.
36. Geisen V, Stengel C, Brem S, et al. Canine leptospirosis infections - clinical signs and outcome with different suspected *Leptospira* serogroups (42 cases). *J Small Anim Pract* 2007;48:324-328.
37. Modric Z. Natural and experimental leptospirosis in the cat. *Veterinarski Arhiv* 1978;48:147-156.
38. Carlos ER, Kundin WD, Watten RH, et al. Leptospirosis in the Philippines: feline studies. *Am J Vet Res* 1971;32:1455-1456.
39. Romero EC, Caly CR, Yasuda PH. The persistence of leptospiral agglutinins titers in human sera diagnosed by the microscopic agglutination test. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1998;40:183-184.

40. Lupidi R, Cinco M, Balanzin D, et al. Serological follow-up of patients involved in a localized outbreak of leptospirosis. *J Clin Microbiol* 1991;29:805-809.
41. Blackmore DK, Schollum LM, Moriarty KM. The magnitude and duration of titres of leptospiral agglutinins in human sera. *N Z Med J* 1984;97:83-86.
42. Higgins R, Cayouette P. Serological diagnosis of leptospirosis in the Province of Quebec. *Can Vet J* 1978;19:13-16.
43. Schowalter DB, Chalmers GA, Johnson GR, et al. A serological survey of *Leptospira interrogans* serotype pomona in Alberta and Saskatchewan striped skunks and possible transmission between cattle and skunks. *Can Vet J* 1981;22:321-323.
44. Ribotta M, Higgins R, Perron D. Swine leptospirosis: low risk of exposure for humans? *Can Vet J* 1999;40:809-810.
45. Higgins R. Emerging or re-emerging bacterial zoonotic diseases: bartonellosis, leptospirosis, Lyme borreliosis, plague. *Rev Sci Tech* 2004;23:569-581.
46. Strutzberg-Minder K, Kreienbrock L. [Leptospire infections in pigs: epidemiology, diagnostics and worldwide occurrence]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2011;124:345-359.
47. Aviat F, Blanchard B, Michel V, et al. *Leptospira* exposure in the human environment in France: A survey in feral rodents and in fresh water. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2009;32:463-476.
48. Duncan C, Krafusur G, Podell B, et al. Leptospirosis and tularaemia in raccoons (*Procyon lotor*) of Larimer County, [corrected] Colorado. *Zoonoses Public Health* 2012;59:29-34.
49. Jardine C, Lindsay LR, Nicholson VM, et al. Longitudinal study on the seroprevalence of avian influenza, leptospirosis, and tularemia in an urban population of raccoons (*Procyon lotor*) in Ontario, Canada. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011;11:37-42.
50. Davis MA, Evermann JF, Petersen CR, et al. Serological survey for antibodies to *Leptospira* in dogs and raccoons in Washington State. *Zoonoses Public Health* 2008;55:436-442.
51. Levesque B, De Serres G, Higgins R, et al. Seroepidemiologic study of three zoonoses (leptospirosis, Q fever, and tularemia) among trappers in Quebec, Canada. *Clin Diagn Lab Immunol* 1995;2:496-498.

52. Jolicoeur H, Daigle G, Jomphe V, et al. Évaluation des densités de rats laveurs et de moufettes rayées dans le cadre des interventions de lutte contre la rage du raton laveur en Montérégie en 2006 et 2007. In. Ministère des Ressources naturelles et de la Faune: Direction de l'expertise sur la faune et Université Laval, Service de consultation statistique; 2009:75p.
53. Mikaelian I, Higgins R, Lequent M, et al. Leptospirosis in raccoons in Quebec: 2 case reports and seroprevalence in a recreational area. *Can Vet J* 1997;38:440-442.
54. Bergeron L, Côté I, Côté N, et al. Enquête sur la séroprévalence de leptospira chez le raton laveur et la moufette rayée. In. Québec: Direction de la santé animale et de l'inspection des viandes Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation; 2011.
55. Prescott JF, McEwen B, Taylor J, et al. Resurgence of leptospirosis in dogs in Ontario: recent findings. *Can Vet J* 2002;43:955-961.
56. Ward MP. Seasonality of canine leptospirosis in the United States and Canada and its association with rainfall. *Prev Vet Med* 2002;56:203-213.
57. Greene CE. Leptospirosis In: Saunders, ed. *Infectious diseases of the dog and cat*. Philadelphia, London, Toronto, Mexico city, Rio de Janeiro, Sydney, Tokyo, : 1998:402-418.
58. Rentko VT, Clark N, Ross LA, et al. Canine leptospirosis. A retrospective study of 17 cases. *J Vet Intern Med* 1992;6:235-244.
59. Harkin KR, Gartrell CL. Canine leptospirosis in New Jersey and Michigan: 17 cases (1990-1995). *J Am Anim Hosp Assoc* 1996;32:495-501.
60. Harkin KR, Roshto YM, Sullivan JT. Clinical application of a polymerase chain reaction assay for diagnosis of leptospirosis in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2003;222:1224-1229.
61. Childs JE, Schwartz BS, Ksiazek TG, et al. Risk factors associated with antibodies to leptospire in inner-city residents of Baltimore: a protective role for cats. *Am J Public Health* 1992;82:597-599.
62. Levett PN. Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. *Clin Infect Dis* 2003;36:447-452.

63. Miller MD, Annis KM, Lappin MR, et al. Variability in results of the microscopic agglutination test in dogs with clinical leptospirosis and dogs vaccinated against leptospirosis. *J Vet Intern Med* 2011;25:426-432.
64. Levett PN, Morey RE, Galloway RL, et al. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *J Med Microbiol* 2005;54:45-49.
65. Ahmed A, Engelberts MF, Boer KR, et al. Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic leptospira species in clinical materials. *PLoS One* 2009;4:e7093.
66. Stoddard RA, Gee JE, Wilkins PP, et al. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009;64:247-255.
67. Slack AT, Symonds ML, Dohnt MF, et al. Identification of pathogenic *Leptospira* species by conventional or real-time PCR and sequencing of the DNA gyrase subunit B encoding gene. *BMC Microbiol* 2006;6:95.
68. Harkin KR, Roshto YM, Sullivan JT, et al. Comparison of polymerase chain reaction assay, bacteriologic culture, and serologic testing in assessment of prevalence of urinary shedding of leptospires in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2003;222:1230-1233.
69. White JD, Malik R, Norris JM. Feline chronic kidney disease: can we move from treatment to prevention? *Vet J* 2011;190:317-322.

2.9 Tables

Table i. Percentage of seropositive and PCR positive cats for *Leptospira* spp. according to potential risk factors

Variable	MAT			PCR		
	Number of cats	% positive	<i>P</i> -Value ^a	Number of cats	% positive	<i>P</i> -Value ^a
Group						
Healthy	125	7.2	.05	125	1.6	.55
Kidney disease	114	14.9		113	5.3	
Time of year^b						
Sept-Nov	58	15.5	.07	58	5.2	.51
Jun-Aug	73	15.1		73	1.4	
Dec-May	108	5.5		107	3.8	
Age (years)						
≤5	23	4.4	.23	23	4.3	.33
6-10	114	7.9		114	0.9	
>10	102	15.7		101	4.9	
Sex						
Female	130	10	.77	130	3.8	.64
Male	109	11.9		108	2.8	
Type of diet						
Canned	6	0	.55	5	0.0	N/A ^c
Mixed	68	14.7		68	4.4	
Dry	165	9.7		165	3	
Other pets in the household						
Yes	173	13.3	.03	172	4.1	.17
No	66	4.6		66	1.5	
Other cat in the household						
Yes	148	15.5	< .01	148	4.1	.20
No	91	3.3		90	2.2	
Dog in the household						
Yes	70	11.4	.36	69	4.3	.94
No	169	10.7		169	3	
Rodents in the household						
Yes	6	0	N/A ^c	6	0.0	N/A ^c
No	233	11.1		232	3.5	

Environment	42	9.5	.93	43	0.0	N/A ^c
Rural	197	11.2		195	4.1	
Urban						
Distance: household to nearest pig farms						
≤1Km	7	0	N/A ^c	7	0.0	N/A ^c
>1Km	232	11.2		231	3.5	
Distance: household to nearest dairy farms						
≤1Km	43	7	.52	43	2.3	.50
>1Km	196	11.8		195	3.6	
Distance: household to nearest goat and/or sheep farms						
≤1Km	30	3.3	.29	30	0.0	N/A ^c
>1Km	209	12		208	3.8	
Outdoor access						
Yes	142	14.8	.03	142	5	.09
No	97	5.1		96	1	
Known hunter						
Yes	70	21.4	< .001	70	7.1	.50
No	169	6.5		168	1.8	
Contact with raccoons						
Yes	69	14.5	.27	69	8.7	.01
No	170	9.4		169	1.2	
Contact with skunks						
Yes	87	18.4	< .01	87	6.9	.03
No	152	6.6		151	1.3	
Contact with wild rodents						
Yes	110	16.3	< .01	110	5.5	.06
No	129	6.2		129	1.6	
Current vaccination status						
Yes	132	13.6	.11	131	4.6	.14
No	107	7.5		107	1.9	

^aP Value (Wald test) for the overall significance of the variable on the seropositivity. P Value < .05 was considered statistically significant.; GEE logistic regression model including the group (H vs. KD) adjusted for the cluster effect. ^bThe time of year Sept-Nov and Jun-Aug were compared to Dec-May. ^cN/A(not available) This variable was excluded from statistical analysis due to difficulty in model convergence.

Table ii. Hematology, serum biochemistry and urinalysis laboratory values in H and KD cats.

Laboratory test	Reference range	GROUP			
		H (n=125 ^a)		KD (n=115 ^b)	
		Median	(min-max)	Median	(min-max)
Hematology					
PVC (%)	28-47	40	(22-53)	33	(18-47.8)
Hb (g/L)	81-42	126	(12-157)	106	(54-154)
RBC (*10E12/L)	6-10.1	8.74	(5.8-11.0)	7.025	(3.9-10.2)
WBC (*10E9/L)	6.3-119.6	6.85	(3.7-24.9)	7.63	(3.0-42.4)
Platelet (*10E9/L)	156-626	252	(17-855)	281	(64-591)
Biochemistry					
ALT (U/L)	16-63	52	(22-278)	51	(18-305)
ALP (U/L)	0-50	24	(6-94)	20	(0-746)
GGT (U/L)	0-10	2	(0-5)	2	(0-6)
T. bilirubin (umol/L)	0-10	6.1	(0-15)	5	(0-23.9)
T. protein (g/L)	59.6-80.8	71	(57.8-89.0)	71.3	(41.6-91.0)
Albumin (g/L)	26-39	30.3	(23.8-37)	30	(21.8-41.6)
Globulin (g/L)	29-47	40.9	(29-60.5)	41.9	(11.1-66)
A/G ratio	0.58-1.16	0.74	(0.43-1.16)	0.73	(0.37-3.64)
SUN (mmol/L)	4.1-10.8	8.78	(4.26-16.1)	15.29	(0.39-512)
Creatinine (umol/L)	51-180	131	(68-198)	243	(144-1895)
Phosphorus (mmol/L)	0.96-1.96	1.41	(0.71-2.17)	1.59	(0.92-8.92)
Sodium (mmol/L)	145-158	151.9	(142-162)	152	(131-173)
Potassium (mmol/L)	3.6-5.3	4.40	(3.50-5.67)	4.45	(1.55-9.95)

Urinalysis^c					
Protein	Neg	0.3	(0-3)	0.3	(0-5)
Blood	Neg	0	(0-250)	5	(0-250)
USG ^d	1.035-1.060	1.052	(1.035-1.060)	1.015	(1.007-1.034)

^a Maximum sample size, ranging from 121 to 125 depending on the assay. ^b Maximum sample size, ranging from 108 to 115 depending on the assay. ^c Urinalysis categorical variables. ^dUSG \geq 1.056 were set at 1.060.

Table iii. Percentage of H and KD cats with glucosuria, bilirubinuria and cristalluria

	Group	
	H (%) (n=125) ^a	KD (%) (n=115)
Glucosuria	7.2	8.7
Bilirubinuria	0.8	1.7
Cristalluria ^b	6.5	4.4

^a Maximum sample size, ranging from 124 to 125 depending on the assay. ^b Only struvites were identified in all cases.

Table iv. Individual MAT titers results of seropositive cats.

Number of cats with similar titer pattern	Serovars			
	Pomona	Bratislava	Grippotyphosa	Icterohaemorrhagiae
1	≥ 1: 12,800	-	-	-
1	≥ 1: 12,800	1: 3,200	-	-
1	≥ 1: 12,800	1: 400	-	-
1 ^a	≥ 1: 12,800	1: 100	1: 100	1: 100
2	≥ 1: 6,400	1: 200	-	-
1 ^a	≥ 1: 6,400	1: 100	-	-
1 ^a	1: 1,600	1: 100	-	-
1	1: 800	-	-	-
1	1: 400	1: 100	-	-
1	1: 400	-	-	-
2	1: 200	-	-	-
3	1: 100	-	-	-
1	1: 100	1: 3,200	-	-
1	-	1: 1,600	1: 100	-
1 ^a	-	1: 100	1: 100	-
6	-	1: 100	-	-
1	-	-	1: 200	-

^aSeropositive cats also positive on urinary PCR (n=4); the remaining PCR positive cats are not identified in the table, as they were seronegative (n=4). Titers ≥ 1: 6,400 and 1:12,800 represent the maximal dilution evaluated by LEPAQ at the time the MAT was performed. All cats included in the study were seronegative for the serovars Hardjo and Canicola.

Table v. Results from multivariate logistic regression analysis predicting a positive MAT status in cats (n=239)^a

Variable	Odds ratio			Predicted-outcome(%) ^b	
	Estimate	95% CI	P-Value	Estimate	95% CI
Group					
KD	2.8	(1.2-6.6)	.02	13.7	(6.6-28.7)
H	Ref.			5.0	
Known hunter					
Yes	3.4	(1.4-8.3)	< .01	15.2	(6.7-33.8)
No	Ref.			4.5	
Other cat in the household					
Yes	6.0	(1.6-22.2)	< .01	20.3	(12.5-32.7)
No	Ref.			3.4	(0.1-11.7)
Time of year					
Sept-Nov	3,0	(0.9-11.7)	.06	11.1	(2.5-32.7)
Jun-Aug	3,6	(1.2-11.0)	.02	13.5	(5.8-31.5)
Dec-May	Ref.			3.7	(1.3-10.8)

^a One KD cat was excluded from this part of the statistical analysis because of missing MAT results. ^b The predicted-outcome (%) was adjusted for the other variables (mean value).

Chapitre 4 : Discussion

Cette section traitera d'une discussion des résultats obtenus qui répondent aux principaux objectifs de notre étude. De plus, certains éléments de la recherche qui n'ont pas été abordés dans l'article, soit par manque d'espace ou simplement parce que non pertinent pour le type d'article, seront approfondis.

Les résultats de l'étude montrent que la séropositivité de la leptospirose est significativement plus élevée chez les chats atteints de maladie rénale (14,9% de 114 chats) comparativement aux chats en santé (7,2% de 125 chats); ceci suggère que la leptospirose est possiblement une cause sous-diagnostiquée de maladie rénale chez le chat. Dans un même ordre d'idée, la prévalence de chats PCR positifs est également plus élevée dans le groupe maladie rénale (MR) (5,3% de 113 chats) lorsque comparé au groupe contrôle (C) (1,6% de 125 chats), bien que cette tendance ne soit pas statistiquement significative. (Tableau VIII).

La proportion significativement plus élevée de chats séropositifs souffrant de maladie rénale en comparaison avec les chats du groupe C soulève la possibilité que la leptospirose joue un rôle dans l'évolution de la maladie rénale féline, ou simplement que la maladie rénale puisse prédisposer l'animal à contracter plus facilement la leptospirose. Plusieurs auteurs ont d'ailleurs suggéré que la leptospirose chronique puisse être la cause de néphrites spontanées chez le chat. [140, 191, 194, 204, 205] Nos résultats supportent en partie cette théorie, bien qu'ils ne puissent la confirmer. Dans l'éventualité où la leptospirose chronique progresse vers une maladie rénale chronique chez le chat, il reste à déterminer dans quelles circonstances le chat change son rôle de porteur chronique pour devenir un hôte susceptible à la bactérie.

La séoprévalence obtenue dans cette étude est similaire aux autres études de séoprévalence rapportant des résultats qui varient entre 4,8 et 35%. (Tableau IV) [48, 69, 189-192, 195-197]

Basé sur les titres sériques les plus élevés, les principaux séovars impliqués chez les chats de notre étude sont Pomona et Bratislava. (Tableau IX)

Tableau VIII. Prévalence (%) et intervalles de confiance (IC) des chats positifs selon le test (MAT ou PCR) et par groupe (contrôle vs. maladie rénale)

	Groupe C		Groupe MR	
	Nombre de chats	Prévalence (IC 95%)	Nombre de chats	Prévalence (IC 95%)
MAT	125	7,2% (2,2-12,2)	114 ^a	14,9% (8,3-21,6)
PCR	125	1,6%(0,3-3,7)	113 ^b	5,3%(1,1-9,5)

Méthode: Ajustement du « clustering » par famille, procédure SURVEYFREQ, SAS 9.3

^aUne donnée manquante pour le MAT dans le groupe MR. ^b Deux données manquantes pour le PCR dans le groupe MR

Tableau IX. Distribution des chats positifs au MAT selon le sérovar ayant le titre le plus élevé (n=25*)

Sérovars	Nombre de chats* (n=25)
Pomona	16
Bratislava	8
Grippytyphosa	1

*Un chat positif a été exclu du tableau comparatif car il possédait des titres équivalents (titres 1 :100) pour Bratislava et Grippytyphosa.

Par rapport au test MAT, les dilutions obtenues étaient souvent les dilutions maximales (7/26) normalement effectuées par le laboratoire de référence, et ce toujours pour le sérovar Pomona (7/16). Chez le chat, étant donné l'absence d'anticorps liés à la vaccination, les titres plus grands que 1 :100 sont habituellement considérés positifs. Ainsi, les titres obtenus dans notre étude sont fortement suggestifs d'une infection active. Cette trouvaille est différente de ce qui est rapporté dans la littérature. Cette dernière rapporte que le chat répond normalement à l'infection avec de faibles titres, autant dans les études expérimentales que dans les études de prévalence avec un intervalle des titres entre 1 :30 et 1 :400. [48, 69, 188, 189, 192, 197, 199, 200, 202] Quoique cette réponse sérologique semble faible, elle est adéquate puisque la leptospirose clinique se développe rarement. [187, 188] Dans très peu d'études, un faible nombre de chats ont eu des titres élevés, mais ces derniers ont rarement dépassé 1:3200. [185, 190, 195, 201]

La réalisation de sérologies pairées, particulièrement sur les chats séropositifs, aurait aidé à expliquer nos résultats. Malheureusement, les titres sérologiques ont été suivis seulement chez 7 des 26 chats séropositifs. Nous avons choisi de suivre ces chats pour diverses raisons : PCR positifs (n=3), titre maximal effectué par le laboratoire (n=3) et accès particulièrement facile à certains chats (n=3) (Tableau X).

Tableau X. Suivi sérologique de sept chats séropositifs

Chats	Groupes	Sérovars impliqués ^a	PCR initiaux ^x	PCR subséquents ^b	Titres Initiaux	Titres subséquents ^c	Antibiotiques ^e
1	C	Bratislava	-	N/E	1 : 3,200	1 : 3,200	Non
2	C	Bratislava	-	N/E	1 : 3,200	1 : 3,200	Non
3	C	Pomona	+	-	≥1 : 6,400	≥1 : 12,800	Oui
4	C	Pomona	-	-	≥1 : 12,800	≥1 : 25,600 ^d	Non
5	C	Pomona	+	-	1 : 100	1 : 400	Non
6	MR	Pomona	+	-	1 : 1,600	1 : 3,200	Oui
7	MR	Pomona	-	N/E	≥ 1 : 6,400	1 : 3,200	Non

^a Basé sur le titre le plus élevé, le sérovar impliqué est demeuré le même lors de l'analyse du sérum pairé; ^b PCR subséquents ont été effectués au même moment que la sérologie pairée.; ^c Le sérum pairé a été réalisé entre la 4^{ème} et la 8^{ème} semaine, à l'exception du chat 6 dont le suivi a été fait 10 mois plus tard. ^d Une dilution supplémentaire a été demandé au laboratoire lors du suivi du chat 4; ^e Antibiotique avec efficacité connue contre la leptospirose administré (suite à la sérologie pairée chez les chats 3 et 5 et lors de l'obtention de la première sérologie chez le chat 6) N/E : Non effectué.

Les chats séropositifs ayant fait l'objet d'un suivi ont été recrutés dans la période comprise entre juin et août (n=4) et celle comprise entre septembre et novembre (n=2), sauf pour le chat numéro 5 qui a été recruté en mars. Deux des sept chats suivis appartenaient au groupe MR. Tous deux souffraient de MRC stade IIb, diagnostiquée dans un cas lors de la première sérologie (chat 6) et plus de 6 mois précédant la première sérologie dans l'autre cas (chat 7). Ces deux chats allaient à l'extérieur et étaient des chasseurs connus.

Les chats 1 et 2, dont les titres sérologiques sont demeurés inchangés, avaient été catégorisés comme des chasseurs connus, mais après vérification, tous deux ne sortaient plus et ne chassaient plus depuis plus d'un an. Ces deux cas supportent les observations faites dans

plusieurs articles sur la longue durée de persistance des anticorps. [121, 123, 124] Chez quatre chats (3 appartenant au groupe C et l'un au groupe MR), les titres ont augmentés lors de l'analyse du sérum pairé, supportant une infection active. [16]

Étant donné que les sérums étaient congelés et envoyés une fois par mois au LEPAQ, nous avons eu un délai important entre la prise de sang et l'obtention des résultats sérologiques. Ceci explique pourquoi les sérums pairés ont été effectués plus de 4 semaines après le prélèvement initial et non 14 jours après, tel que recommandé cliniquement. Le délai explique également pourquoi le clinicien en charge du cas a préféré attendre les résultats d'un sérum pairé avant de traiter des chats en santé, même s'ils présentaient des titres élevés, donc suggestifs d'une infection active. Seulement trois chats ont été traités avec des antibiotiques. Les chats 3 et 5 ont été traités suite à la sérologie pairée, car celle-ci a démontré une augmentation des titres. Le chat 6, a été traité avec des antibiotiques lors de l'obtention de sa première sérologie. Un suivi sérologique et de PCR a été réalisé 10 mois après et a démontré une augmentation des titres à 1 :3200. Le résultat de la PCR était négatif. Dix-huit mois plus tard, un dernier suivi sérologique et de PCR a été réalisé chez le chat 6, les titres sont restés stables et la PCR était de nouveau négative. Ces cas confirment aussi la longue durée de persistance des anticorps, bien qu'une réinfection à partir de leur environnement était également possible, puisque 5 des 7 chats avaient accès à l'extérieur et continuaient à chasser.

Cette étude a mis en évidence certains facteurs de risque liés à la séropositivité et ce, suite à l'analyse des données recueillies par un questionnaire complété par les propriétaires au moment de l'examen physique (Annexe 1). Ces facteurs de risque ont été analysés à l'aide d'un modèle de régression logistique multivarié. Quatre variables se sont révélées statistiquement significatives : le groupe (C et MR), le statut de chasseur, la présence d'autres chats à la maison et la période de l'année.

Les chats ayant accès à l'extérieur, mais surtout ceux avec un comportement de chasseur ($p < 0,01$), se retrouvent en contact étroit avec des réservoirs potentiels. Ce sont deux variables qui étaient statistiquement significatives et très corrélées dans le modèle multivarié. Plusieurs espèces animales peuvent servir de réservoir pour un ou plusieurs sérovars de *Leptospira* [36,

52, 135] et le chat peut se contaminer en entrant en contact avec l'urine des animaux de la faune ou d'autres animaux domestiques.

Le réchauffement climatique et l'apparition plus fréquente de phénomènes climatiques extrêmes (inondations) sont responsables en partie de la réémergence de la leptospirose. [12] En plus, l'augmentation de contacts entre les animaux domestiques et ceux de la faune (considérés comme des réservoirs primaires de *Leptospira spp*) est aussi responsable de la réémergence de la leptospirose. En effet, l'urbanisation grandissante et l'adaptation de la faune aux milieux urbains peuvent favoriser les contacts entre les animaux domestiques et ceux de la faune. [53, 54, 206] Une enquête sérologique faite par le MAPAQ en 2007 a démontré que les ratons laveurs et les mouffettes sont un réservoir important pour la leptospirose dans la région sud de la Montérégie, principalement pour les sérovars Grippotyphosa, Automnalis, Pomona et Bratislava. [54] En fait, au Québec, la population de raton laveurs est imposante. [207] Une étude faite en 1997 dans un centre récréatif de la région du Mont-Orford au Québec a démontré que les ratons laveurs peuvent représenter une source potentielle de contamination pour les humains et les animaux domestiques; dans cette étude, la séropositivité a été démontrée pour les sérovars Pomona, Hardjo, Bratislava et Icterohaemorrhagiae. [52] Au Canada, la faune sauvage représente aussi un réservoir primaire important pour la leptospirose. Des études montrent qu'en Saskatchewan et en Alberta, les mouffettes sont aussi un réservoir primaire pour le sérovar Pomona. [208, 209]

À la lumière de nos résultats, le chat se contamine possiblement suite à un contact direct ou indirect (contamination de l'environnement) avec les animaux de la faune, puisque les trois sérovars les plus fréquents dans notre étude, soit Pomona, Bratislava et Grippotyphosa, sont aussi les plus séroprévalents chez le raton laveur et la mouffette au Québec. [54]

Les huit chats PCR positifs ont confirmé la possibilité d'un statut excréteur chez le chat; 6 d'entre eux appartenaient au groupe MR et 2 au groupe C. La PCR positive chez les chats en santé suggère que les chats peuvent être des porteurs asymptomatiques, devenant ainsi une source potentielle d'infection pour leur propriétaire et leur environnement. Ceci rappelle le statut de porteur chronique suggéré chez les chiens en santé. [130] De plus, il est important de

souligner qu'un résultat de PCR négatif n'exclut pas la possibilité d'une excrétion intermittente. [80, 160]

Des six sérovars inclus dans l'étude, aucun chat ne s'est avéré séropositif pour deux d'entre eux, soit Hardjo et Canicola. Le sérovar Hardjo était le sérovar le plus isolé dans les cas d'avortement et infertilité chez la vache en Amérique du nord, [63, 65, 66] mais il n'est plus l'un des sérovars les plus fréquemment impliqués dans les cas de leptospirose chez le chien. [58] Quant à Canicola, il était l'un des trois sérovars les plus isolés dans les cas cliniques de leptospirose chez le chien en Amérique du nord avec plus récemment Pomona et Bratislava. [23, 58, 93]

Nous tenons à réitérer que limiter le nombre de sérovars testés lors de MAT peut résulter en l'obtention de résultats sérologiques faussement négatifs. [16] Il aurait donc été très intéressant d'inclure un plus grand nombre de sérovars. Par exemple, des réactions croisées sont documentées entre les sérovars Autumnalis et Pomona. [2] Étant donné le nombre de cas séropositifs pour Pomona, il aurait été intéressant de vérifier cette problématique dans notre étude.

Plusieurs études récentes chez le chien et chez l'humain suggèrent que le test MAT ne doit pas être utilisé pour prédire le sérovar infectieux à cause de réactions croisées. [16, 118, 126] Dans notre étude, cette problématique semble moins probable, puisque malgré les réactions croisées potentielles, le titre du 2^{ème} sérovar à être positif était toujours significativement plus bas que le sérovar dit infectieux.

Nous avons tenté d'obtenir plusieurs informations pertinentes à l'aide d'un questionnaire complété par le propriétaire (Annexe 1). Lors de l'analyse des résultats, nous avons réalisé les limites de ce questionnaire. Certaines questions laissaient malheureusement place à plus d'interprétation que nous ne l'avions initialement anticipé. Par exemple, à la question "Est-ce que votre chat a pu être en contact avec des animaux sauvages?", il est difficile de savoir quel élément permettait aux propriétaires de répondre "oui": le simple fait d'avoir un chat allant à l'extérieur, le fait d'avoir vu des animaux sauvages sur leur terrain ou encore l'observation

d'un contact réel entre leur chat et la faune. À l'inverse, certains propriétaires résidant dans une zone hautement peuplée par des rats laveurs et/ou des mouffettes ont possiblement répondu « non » simplement parce qu'ils n'ont jamais personnellement observé un tel contact. La question aurait pu être reformulée pour diminuer la subjectivité : « Avez-vous déjà vu des animaux sauvages sur votre terrain? ». De façon similaire, une section du questionnaire interrogeait sur la présence ou l'absence de certains signes cliniques. Hors, un nombre significatif de chats catégorisés dans le groupe C, i.e. avec un examen physique normal ainsi qu'une hématologie, une biochimie et une analyse urinaire normales, présentaient des signes cliniques selon leur propriétaire (e.g. vomissement, mauvaise haleine, amaigrissement, diminution de l'appétit, diarrhée). Cette section n'a donc pas pu être utilisée pour des fins d'analyse statistiques. Après réflexion, il est compréhensible qu'un propriétaire d'un chat sain coche « vomissement » si son chat a des vomissements occasionnels engendrés par des trichobézoars ou encore, « mauvaise haleine », s'il a une quantité significative de tartre ou de gingivite. En fait, le clinicien traitant, et non le propriétaire, aurait dû compléter cette section du questionnaire suite à son anamnèse.

Il aurait été idéal d'inclure un plus grand nombre de chats pour évaluer le statut excréteur des chats et certaines variables, comme le stade de MR. Le nombre de cas inclus était basé sur des données préliminaires de séropositivité, [191, 197] car aucune donnée de PCR chez le chat n'est disponible. Bien que des chats de tous les stades de MRC et des chats avec IRA aient été recrutés (Tableau XI), aucune relation statistiquement significative n'a été mise en évidence entre le stade de la maladie rénale et la séropositivité.

Il est à noter que les chats avec une maladie rénale de stade I ont été exclus du groupe MR à cause de la difficulté à établir avec certitude le diagnostic. En fait, dans un stade précoce de maladie rénale, la capacité de concentrer l'urine peut être affectée, mais l'azotémie n'est pas encore présente. Pour pouvoir inclure ces chats dans l'étude, des tests plus spécifiques (e.g. détermination de la filtration glomérulaire) auraient été nécessaires.

Tableau XI. Distribution (nombre et pourcentage) des chats avec maladie rénale (n=115), selon le type et le stade

	Nombre de chats	Pourcentage (%)
IRA	19	16,5
MRC stade IIb	61	53
MRC stade III	33	28,7
MRC stade IV	2	1,8

IRA : Insulte rénale aiguë. MRC : Maladie rénale chronique

Conclusion

Cette étude a démontré que les chats atteints de maladie rénale étaient plus souvent séropositifs que les chats en santé. Ceci soulève la possibilité que la leptospirose féline soit sous-diagnostiquée par les vétérinaires, car elle est rarement considérée dans le diagnostic différentiel de maladie rénale. Cette étude poussera les vétérinaires à investiguer pour la leptospirose sur une base plus régulière les chats atteints de maladie rénale.

Bien que cette étude ait démontré une séoprévalence significativement plus élevée chez les chats souffrant de maladie rénale, d'autres études seront nécessaires dans le but de vérifier le rôle exact de *Leptospira spp.* dans le développement et l'évolution de la maladie rénale féline. Par exemple, une étude prospective idéale pourrait effectuer un suivi sérologique annuel à bi-annuel chez des chats séropositifs en santé, en combinant la sérologie à une PCR en temps réel au niveau urinaire et sanguin, tout en suivant les signes d'apparition de maladie rénale; des chats séronégatifs en santé pourraient servir de groupe contrôle. Ceci faciliterait l'interprétation du comportement des titres sérologiques. Suite au décès des chats, une nécropsie complète avec analyse des lésions histopathologiques serait également intéressante pour évaluer l'existence des lésions au niveau rénal et/ou hépatique.

Au niveau de l'aspect santé publique, notre étude a démontré que certains chats sont effectivement porteurs asymptomatiques, ils peuvent excréter des leptospires dans leur urine et devenir ainsi une source d'infection potentielle pour leur propriétaire et pour l'environnement. Étant donné le très faible pourcentage d'excréteurs, les chats devraient faire partie des éléments d'enquête lors d'un cas humain de leptospirose.

Bibliographie

1. Ko, A.I., C. Goarant, and M. Picardeau, *Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen*. Nat Rev Microbiol, 2009. 7(10): p. 736-47.
2. Levett, P.N., *Leptospirosis*. Clin Microbiol Rev, 2001. 14(2): p. 296-326.
3. Palaniappan, R.U., et al., *Evaluation of lig-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospires*. Mol Cell Probes, 2005. 19(2): p. 111-7.
4. McBride, A.J., et al., *Leptospirosis*. Curr Opin Infect Dis, 2005. 18(5): p. 376-86.
5. Weil, A., *Icterus und Nephritis einhergehende akute infektions krankheit*. Dtsche. Arch. Klin. Med., 1886. 39: p. 209–232.
6. Inada, R., et al., [*Scientific raisins from 125 years SMW (Swiss Medical Weekly). A brief report on the discovery of the pathogen (Spirochaeta icterohaemorrhagiae nov. sp.) of so-called Weil's disease in Japan and on current studies of the disease. 1916*]. Schweiz Med Wochenschr, 1995. 125(16): p. 816-26.
7. Klarenbeek, A. and W.A.P. Schuffner, *Het voorkomen van een afwijkend leptospira-ras in Nederland*. . Ned. Tijdschr. Geneesk., 1933. 77: p. 4271–4276.
8. Esseveld, H. and W.A. Collier, *Leptospirosis of cats in Java*. Veterinary Bulletin, 1940. 9: p. 462.
9. Greene, C.E., *Leptospirosis in Infectious diseases of the dog and cat*, Saunders, Editor. 1998: Philadelphia, London, Toronto, Mexico city, Rio de Janeiro, Sydney, Tokyo, . p. 402-418.
10. Denis, F., et al., *Bacteriologie medicale*. 2007: Masson.
11. Perolat, P., et al., *Characterization of Leptospira isolates from serovar hardjo by ribotyping, arbitrarily primed PCR, and mapped restriction site polymorphisms*. J Clin Microbiol, 1994. 32(8): p. 1949-57.
12. Picardeau, M., *Diagnosis and epidemiology of leptospirosis*. Med Mal Infect, 2013. 43(1): p. 1-9.
13. Cerqueira, G.M. and M. Picardeau, *A century of Leptospira strain typing*. Infection, Genetics and Evolution, 2009. 9(5): p. 760-768.
14. Morey, R.E., et al., *Species-specific identification of Leptospiraceae by 16S rRNA gene sequencing*. J Clin Microbiol, 2006. 44(10): p. 3510-6.
15. Langston, C.E. and K.J. Heuter, *Leptospirosis. A re-emerging zoonotic disease*. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 2003. 33(4): p. 791-807.
16. Sykes, J.E., et al., *2010 ACVIM small animal consensus statement on leptospirosis: diagnosis, epidemiology, treatment, and prevention*. J Vet Intern Med, 2011. 25(1): p. 1-13.

17. Harkness, A.C., B.L. Smith, and G.F. Fowler, *An isolation of Leptospira serotype pomona from domestic cat*. N Z Vet J, 1970. 18(8): p. 175-6.
18. Michna, S.W. and R.S. Campbell, *Leptospirosis in wild animals*. J Comp Pathol, 1970. 80(1): p. 101-6.
19. Michna, S.W., *Leptospirosis*. Vet Rec, 1970. 86(17): p. 484-96.
20. Rentko, V.T., et al., *Canine leptospirosis. A retrospective study of 17 cases*. J Vet Intern Med, 1992. 6(4): p. 235-44.
21. Harkin, K.R. and C.L. Gartrell, *Canine leptospirosis in New Jersey and Michigan: 17 cases (1990-1995)*. J Am Anim Hosp Assoc, 1996. 32(6): p. 495-501.
22. Birnbaum, N., et al., *Naturally acquired leptospirosis in 36 dogs: serological and clinicopathological features*. J Small Anim Pract, 1998. 39(5): p. 231-6.
23. Ward, M.P., *Seasonality of canine leptospirosis in the United States and Canada and its association with rainfall*. Prev Vet Med, 2002. 56(3): p. 203-13.
24. Ristow, P., *LA LEPTOSPIROSE: LES DÉFIS ACTUELS D'UNE ANCIENNE MALADIE* Bull. Acad. Vét. France 2007. 160(4): p. 267-278.
25. Bharti, A.R., et al., *Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance*. Lancet Infect Dis, 2003. 3(12): p. 757-71.
26. W.H.O., *Leptospirosis worldwide*. Wkly Epidemiol Rec, 1999. 74(29): p. 237-242.
27. W.H.O., *Human Leptospirosis, Guidances for diagnosis, surveillance and control*. 2003.
28. W.H.O., *Leptospirosis scientific meeting, Manila, November 2008*. Wkly Epidemiol Rec, 2009. 6(84): p. 41-48.
29. W.H.O., *Leptospirosis: an emerging public health problem*. Wkly Epidemiol Rec, 2011. 6(86): p. 45-52.
30. Pappas, G., et al., *The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends*. Int J Infect Dis, 2008. 12(4): p. 351-7.
31. Cerri, D., et al., *Epidemiology of leptospirosis: observations on serological data obtained by a "diagnostic laboratory for leptospirosis" from 1995 to 2001*. New Microbiol, 2003. 26(4): p. 383-9.
32. W.H.O., *Report of the first meeting of the leptospirosis burden epidemiology reference group*. 2010.

33. Levesque, B., et al., *Seroprevalence of zoonoses in a Cree community (Canada)*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2007. 59(3): p. 283-6.
34. Sampasa, H., *Seroprevalence de neuf zoonoses dans deux communautés crie de la Baie-James (Canada)*, 2010: Laval.
35. Campagna, S., *Prevalence and environmental risk factors for ten zoonoses in two cree communities of james bay (canada)*, in *Centre universitaire de formation en environnement*2009, Université de Sherbrooke.
36. Levesque, B., et al., *Seroepidemiologic study of three zoonoses (leptospirosis, Q fever, and tularemia) among trappers in Quebec, Canada*. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1995. 2(4): p. 496-8.
37. Vincent C, et al. *La leptospirose: Cas de transmission d'un chien à un humain*. . 2007 [cited 2010].
38. Evangelista, K.V. and J. Coburn, *Leptospira as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses*. *Future Microbiol*, 2010. 5(9): p. 1413-25.
39. Kingscote, B.F., *Leptospirosis: an occupational hazard to veterinarians*. *Can Vet J*, 1986. 27(2): p. 78-81.
40. PAHO, *Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals*, in *Leptospirosis. In: Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals*, P.N. Acha and B. Szyfres, Editors. 2001, Pan American Health Organization: Washington, DC. p. 157-168.
41. Baer, R., et al., *Leptospirosis in a small animal veterinarian: reminder to follow standardized infection control procedures*. *Zoonoses Public Health*, 2010. 57(4): p. 281-4.
42. Prescott, J., *Canine leptospirosis in Canada: a veterinarian's perspective*. *CMAJ*, 2008. 178(4): p. 397-8.
43. Whitney, E.A., et al., *Prevalence of and risk factors for serum antibodies against Leptospira serovars in US veterinarians*. *J Am Vet Med Assoc*, 2009. 234(7): p. 938-44.
44. Barmettler, R., et al., *Assessment of exposure to Leptospira serovars in veterinary staff and dog owners in contact with infected dogs*. *J Am Vet Med Assoc*, 2011. 238(2): p. 183-8.
45. Stern, E.J., et al., *Outbreak of leptospirosis among Adventure Race participants in Florida, 2005*. *Clin Infect Dis*, 2010. 50(6): p. 843-9.
46. Morgan, J., et al., *Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998*. *Clin Infect Dis*, 2002. 34(12): p. 1593-9.
47. Ciceroni, L., et al., *Epidemiological trend of human leptospirosis in Italy between 1994 and 1996*. *Eur J Epidemiol*, 2000. 16(1): p. 79-86.

48. Millan, J., et al., *Leptospirosis in wild and domestic carnivores in natural areas in Andalusia, Spain*. Vector Borne Zoonotic Dis, 2009. 9(5): p. 549-54.
49. Richardson, D.J. and J.L. Gauthier, *A serosurvey of leptospirosis in Connecticut peridomestic wildlife*. Vector Borne Zoonotic Dis, 2003. 3(4): p. 187-93.
50. Himsworth, C., et al., *Ecology of Leptospira interrogans in Norway Rats (Rattus norvegicus) in an Inner-City Neighborhood of Vancouver, Canada*. PLoS Negl Trop Dis., 2013. 7((6)): p. 1-9.
51. Lilenbaum, W., et al., *[Serologic study for detecting anti-Leptospira antibodies in Rattus norvegicus from Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil]*. Rev Latinoam Microbiol, 1993. 35(4): p. 357-80.
52. Mikaelian, I., et al., *Leptospirosis in raccoons in Quebec: 2 case reports and seroprevalence in a recreational area*. Can Vet J, 1997. 38(7): p. 440-2.
53. Mitchell, M.A., et al., *Serologic survey for selected infectious disease agents in raccoons from Illinois*. J Wildl Dis, 1999. 35(2): p. 347-55.
54. Bergeron, L., et al., *Enquête sur la séroprévalence de leptospira chez le raton laveur et la moufette rayée*, 2011, Direction de la santé animale et de l'inspection des viandes. Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation: Québec.
55. Prescott, J.F., et al., *Resurgence of leptospirosis in dogs in Ontario: recent findings*. Can Vet J, 2002. 43(12): p. 955-61.
56. Ward, M.P., L.T. Glickman, and L.E. Guptill, *Prevalence of and risk factors for leptospirosis among dogs in the United States and Canada: 677 cases (1970-1998)*. J Am Vet Med Assoc, 2002. 220(1): p. 53-8.
57. Bolin, C.A., *Diagnosis of leptospirosis: a reemerging disease of companion animals*. Semin Vet Med Surg (Small Anim), 1996. 11(3): p. 166-71.
58. Gautam, R., et al., *Detection of antibodies against Leptospira serovars via microscopic agglutination tests in dogs in the United States, 2000-2007*. J Am Vet Med Assoc, 2010. 237(3): p. 293-8.
59. Edwards, C.N. and P.N. Levett, *Prevention and treatment of leptospirosis*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2004. 2(2): p. 293-8.
60. Otaka, D.Y., et al., *Serology and PCR for bovine leptospirosis: herd and individual approaches*. Vet Rec, 2012. 170(13): p. 338.
61. Roqueplo, C., et al., *Epidemiological study of animal leptospirosis in new caledonia*. Vet Med Int, 2013. 2013: p. 1-6.

62. Ngbede, E.O., et al., *Serological prevalence of leptospirosis in cattle slaughtered in the Zango abattoir in Zaria, Kaduna State, Nigeria*. Vet Ital, 2012. 48(2): p. 179-84.
63. Prescott, J.F., et al., *Seroprevalence and association with abortion of leptospirosis in cattle in Ontario*. Can J Vet Res, 1988. 52(2): p. 210-5.
64. Richardson, G.F., E. Spangler, and E.B. MacAulay, *A serological survey of four Leptospira serovars in dairy cows on Prince Edward Island*. Can Vet J, 1995. 36(12): p. 769-70.
65. Lilenbaum, W. and G.N. Souza, *Factors associated with bovine leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil*. Res Vet Sci, 2003. 75(3): p. 249-51.
66. Grooms, D.L., *Reproductive losses caused by bovine viral diarrhea virus and leptospirosis*. Vol. 66. 2006.
67. Carroll, A.G. and R.S. Campbell, *Reproductive and leptospiral studies on beef cattle in central Queensland*. Aust Vet J, 1987. 64(1): p. 1-5.
68. Ellis, W.A., J.J. O'Brien, and J. Cassells, *Role of cattle in the maintenance of Leptospira interrogans serotype hardjo infection in Northern Ireland*. Vet Rec, 1981. 108(26): p. 555-7.
69. Dickeson, D. and D.N. Love, *A serological survey of dogs, cats and horses in south-eastern Australia for leptospiral antibodies*. Aust Vet J, 1993. 70(10): p. 389-90.
70. Ebani, V.V., et al., *Seroprevalence of Leptospira spp. and Borrelia burgdorferi sensu lato in Italian horses*. Ann Agric Environ Med, 2012. 19(2): p. 237-40.
71. Faber, N.A., et al., *Detection of Leptospira spp. in the aqueous humor of horses with naturally acquired recurrent uveitis*. J Clin Microbiol, 2000. 38(7): p. 2731-3.
72. Pinna, A.E., et al., *Molecular diagnostics of leptospirosis in horses is becoming increasingly important*. Vet Microbiol, 2011. 153(3-4): p. 413.
73. Kitson-Piggot, A.W. and J.F. Prescott, *Leptospirosis in horses in Ontario*. Can J Vet Res, 1987. 51(4): p. 448-51.
74. Baverud, V., et al., *Leptospira seroprevalence and associations between seropositivity, clinical disease and host factors in horses*. Acta Vet Scand, 2009. 51: p. 15.
75. Greenlee, J.J., et al., *Experimental canine leptospirosis caused by Leptospira interrogans serovars pomona and bratislava*. Am J Vet Res, 2005. 66(10): p. 1816-22.
76. Abgueguen, P. and E. Pichard, *[Leptospirosis]*. Rev Prat, 2009. 59(5): p. 665-73.
77. Houpiqian P, P.P., B. G., and B. P., *Leptospirosis. Leptospiroses*. , ed. E.S.e. Medicales. 2002, Paris: Elsevier SAS.

78. Murray, G.L., *The lipoprotein LipL32, an enigma of leptospiral biology*. Vet Microbiol, 2013. 162(2-4): p. 305-14.
79. Wagenaar, J.A., R.P. Segers, and B.A. Van der Zeijst, *Rapid and specific detection of pathogenic Leptospira species by amplification of ribosomal sequences*. Mol Biotechnol, 1994. 2(1): p. 1-14.
80. Harkin, K.R., et al., *Comparison of polymerase chain reaction assay, bacteriologic culture, and serologic testing in assessment of prevalence of urinary shedding of leptospires in dogs*. J Am Vet Med Assoc, 2003. 222(9): p. 1230-3.
81. Farr, R.W., *Leptospirosis*. Clin Infect Dis, 1995. 21(1): p. 1-6; quiz 7-8.
82. Lee, S.H., et al., *Cytotoxic activities of Leptospira interrogans hemolysin SphH as a pore-forming protein on mammalian cells*. Infect Immun, 2002. 70(1): p. 315-22.
83. Lee, S.H., et al., *Identification and partial characterization of a novel hemolysin from Leptospira interrogans serovar lai*. Gene, 2000. 254(1-2): p. 19-28.
84. Barnett, J.K., et al., *Expression and distribution of leptospiral outer membrane components during renal infection of hamsters*. Infect Immun, 1999. 67(2): p. 853-61.
85. Palaniappan, R.U., S. Ramanujam, and Y.F. Chang, *Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis*. Curr Opin Infect Dis, 2007. 20(3): p. 284-92.
86. Goldstein, R.E., et al., *Influence of infecting serogroup on clinical features of leptospirosis in dogs*. J Vet Intern Med, 2006. 20(3): p. 489-94.
87. Sessions, J.K. and C.E. Greene, *Canine Leptospirosis: Epidemiology, pathogenesis, and diagnosis*, in *Compendium 2004*. p. 606-617.
88. Pereira, M.M., et al., *Experimental leptospirosis in marmoset monkeys (Callithrix jacchus): a new model for studies of severe pulmonary leptospirosis*. Am J Trop Med Hyg, 2005. 72(1): p. 13-20.
89. Abdulkader, R.C., et al., *Leptospirosis severity may be associated with the intensity of humoral immune response*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2002. 44(2): p. 79-83.
90. Greene, C.E., *Diagnosis, therapy, and prevention of common infectious diseases in the dog*. Vet Q, 1994. 16 Suppl 1: p. 2S-5S.
91. Faine, S., B. C., and P. P., *Leptospira and Leptospirosis*. MedScience, ed. A. Melbourne. 1999
92. Higgins, R., *A minireview of the pathogenesis of acute leptospirosis*. Can Vet J, 1981. 22(9): p. 277-8.

93. Adin, C.A. and L.D. Cowgill, *Treatment and outcome of dogs with leptospirosis: 36 cases (1990-1998)*. J Am Vet Med Assoc, 2000. 216(3): p. 371-5.
94. Klopfleisch, R., et al., *An emerging pulmonary haemorrhagic syndrome in dogs: similar to the human leptospiral pulmonary haemorrhagic syndrome?* Vet Med Int, 2010. 2010: p. 1-7.
95. Boutilier, P., A. Carr, and R.L. Schulman, *Leptospirosis in dogs: a serologic survey and case series 1996 to 2001*. Vet Ther, 2003. 4(4): p. 387-96.
96. Kohn, B., et al., *Pulmonary abnormalities in dogs with leptospirosis*. J Vet Intern Med, 2010. 24(6): p. 1277-82.
97. Townsend, W.M., J. Stiles, and S.G. Krohne, *Leptospirosis and panuveitis in a dog*. Vet Ophthalmol, 2006. 9(3): p. 169-73.
98. Houwers, D.J., et al., *Agglutinating antibodies against pathogenic Leptospira in healthy dogs and horses indicate common exposure and regular occurrence of subclinical infections*. Vet Microbiol, 2011. 148(2-4): p. 449-51.
99. Morrison, W.I. and N.G. Wright, *Canine leptospirosis: an immunopathological study of interstitial nephritis due to Leptospira canicola*. J Pathol, 1976. 120(2): p. 83-9.
100. Ortega-Pacheco, A., et al., *Frequency and type of renal lesions in dogs naturally infected with leptospira species*. Ann N Y Acad Sci, 2008. 1149: p. 270-4.
101. Ramos, A.C., G.N. Souza, and W. Lilenbaum, *Influence of leptospirosis on reproductive performance of sows in Brazil*. Theriogenology, 2006. 66(4): p. 1021-5.
102. Pearson, J.K., D.P. Mackie, and W.A. Ellis, *Milk drop syndrome resulting from Leptospira hardjo*. Vet Rec, 1980. 106(6): p. 135-6.
103. Leon, A., et al., *Identification of pathogenic Leptospira strains in tissues of a premature foal by use of polymerase chain reaction analysis*. J Vet Diagn Invest, 2006. 18(2): p. 218-21.
104. Brem, S., et al., *[Demonstration of intraocular leptospira in 4 horses suffering from equine recurrent uveitis (ERU)]*. Berl Munch Tierarztl Wochenschr, 1998. 111(11-12): p. 415-7.
105. Wollanke, B., et al., *[Intraocular and serum antibody titers to Leptospira in 150 horses with equine recurrent uveitis (ERU) subjected to vitrectomy]*. Berl Munch Tierarztl Wochenschr, 1998. 111(4): p. 134-9.
106. Divers, T.J., T.D. Byars, and S.J. Shin, *Renal dysfunction associated with infection of Leptospira interrogans in a horse*. J Am Vet Med Assoc, 1992. 201(9): p. 1391-2.
107. Hogan, P.M., et al., *Acute renal disease due to Leptospira interrogans in a weanling*. Equine Vet J, 1996. 28(4): p. 331-3.

108. Frazer, M.L., *Acute renal failure from leptospirosis in a foal*. Aust Vet J, 1999. 77(8): p. 499-500.
109. Yan, W., et al., *Experimental Leptospira interrogans serovar Kennewicki infection of horses*. J Vet Intern Med, 2010. 24(4): p. 912-7.
110. Hamond, C., G. Martins, and W. Lilenbaum, *Pulmonary hemorrhage in horses seroreactive to leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil*. J Vet Intern Med, 2012. 26(6): p. 1237; author reply 1238.
111. Broux, B., et al., *Acute respiratory failure caused by Leptospira spp. in 5 foals*. J Vet Intern Med, 2012. 26(3): p. 684-7.
112. Seguro, A.C. and L. Andrade, *Pathophysiology of Leptospirosis*. Shock, 2013.
113. Verma, A. and B. Stevenson, *Leptospiral uveitis - there is more to it than meets the eye!* Zoonoses Public Health, 2012. 59 Suppl 2: p. 132-41.
114. Mastroilli, C., et al., *Clinicopathologic features and outcome predictors of Leptospira interrogans Australis serogroup infection in dogs: a retrospective study of 20 cases (2001-2004)*. J Vet Intern Med, 2007. 21(1): p. 3-10.
115. Baumann, D. and M. Fluckiger, *Radiographic findings in the thorax of dogs with leptospiral infection*. Vet Radiol Ultrasound, 2001. 42(4): p. 305-7.
116. Forrest, L.J., et al., *Sonographic renal findings in 20 dogs with leptospirosis*. Vet Radiol Ultrasound, 1998. 39(4): p. 337-40.
117. Holloway, A. and R. O'Brien, *Perirenal effusion in dogs and cats with acute renal failure*. Vet Radiol Ultrasound, 2007. 48(6): p. 574-9.
118. Levett, P.N., *Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis*. Clin Infect Dis, 2003. 36(4): p. 447-52.
119. Fraune, C.K., A. Schweighauser, and T. Francey, *Evaluation of the diagnostic value of serologic microagglutination testing and a polymerase chain reaction assay for diagnosis of acute leptospirosis in dogs in a referral center*. J Am Vet Med Assoc, 2013. 242(10): p. 1373-80.
120. Vijayachari, P., et al., *Evaluation of darkground microscopy as a rapid diagnostic procedure in leptospirosis*. Indian J Med Res, 2001. 114: p. 54-8.
121. Romero, E.C., C.R. Caly, and P.H. Yasuda, *The persistence of leptospiral agglutinins titers in human sera diagnosed by the microscopic agglutination test*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 1998. 40(3): p. 183-4.
122. Hartman, E.G., et al., *Serodiagnosis of canine leptospirosis by solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay*. Vet Immunol Immunopathol, 1984. 7(1): p. 33-42.

123. Blackmore, D.K., L.M. Schollum, and K.M. Moriarty, *The magnitude and duration of titres of leptospiral agglutinins in human sera*. N Z Med J, 1984. 97(749): p. 83-6.
124. Lupidi, R., et al., *Serological follow-up of patients involved in a localized outbreak of leptospirosis*. J Clin Microbiol, 1991. 29(4): p. 805-9.
125. Iwamoto, E., et al., *Nationwide survey of leptospira antibodies in dogs in Japan: results from microscopic agglutination test and enzyme-linked immunosorbent assay*. J Vet Med Sci, 2009. 71(9): p. 1191-9.
126. Miller, M.D., et al., *Variability in results of the microscopic agglutination test in dogs with clinical leptospirosis and dogs vaccinated against leptospirosis*. J Vet Intern Med, 2011. 25(3): p. 426-32.
127. Ghneim, G.S., et al., *Use of a case-control study and geographic information systems to determine environmental and demographic risk factors for canine leptospirosis*. Vet Res, 2007. 38(1): p. 37-50.
128. Geisen, V., et al., *Canine leptospirosis infections - clinical signs and outcome with different suspected Leptospira serogroups (42 cases)*. J Small Anim Pract, 2007. 48(6): p. 324-8.
129. Smythe, L.D., et al., *The microscopic agglutination test (MAT) is an unreliable predictor of infecting Leptospira serovar in Thailand*. Am J Trop Med Hyg, 2009. 81(4): p. 695-7.
130. Harkin, K.R., Y.M. Roshto, and J.T. Sullivan, *Clinical application of a polymerase chain reaction assay for diagnosis of leptospirosis in dogs*. J Am Vet Med Assoc, 2003. 222(9): p. 1224-9.
131. Levett, P.N., et al., *Two methods for rapid serological diagnosis of acute leptospirosis*. Clin Diagn Lab Immunol, 2001. 8(2): p. 349-51.
132. Ribotta, M.J., et al., *Development of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of leptospiral antibodies in dogs*. Can J Vet Res, 2000. 64(1): p. 32-7.
133. Vanasco, N.B., et al., *Development and validation of an ELISA for the detection of leptospire-specific antibodies in rodents*. Vet Microbiol, 2001. 82(4): p. 321-30.
134. Joseph, S., et al., *Evaluation and comparison of native and recombinant LipL21 protein-based ELISAs for diagnosis of bovine leptospirosis*. J Vet Sci, 2012. 13(1): p. 99-101.
135. Andre-Fontaine, G., *Leptospirosis*, in *Infectious and parasitic diseases in livestock*. 2010, Lavoisier. p. 1139-1149.
136. Mulla, S., et al., *Diagnosis of leptospirosis and comparison of ELISA and MAT techniques*. Indian J Pathol Microbiol, 2006. 49(3): p. 468-70.

137. Bolin, C.A., R.L. Zuerner, and G. Trueba, *Comparison of three techniques to detect Leptospira interrogans serovar hardjo type hardjo-bovis in bovine urine*. Am J Vet Res, 1989. 50(7): p. 1001-3.
138. Hodges, R.T. and M.O. Ekdahl, *Use of a fluorescent antibody technique for the serological differentiation of leptospiral serotypes in cultures and in bovine urine*. N Z Vet J, 1973. 21(6): p. 109-15.
139. Sharma, K.K. and U. Kalawat, *Early diagnosis of leptospirosis by conventional methods: one-year prospective study*. Indian J Pathol Microbiol, 2008. 51(2): p. 209-11.
140. Andre-Fontaine, G., *Transmission de la leptospirose à l'homme*. Le nouveau praticien vétérinaire, 2004. 210.
141. Anderson, J.F., et al., *Isolation of Leptospira interrogans serovar grippityphosa from the skin of a dog*. J Am Vet Med Assoc, 1993. 203(11): p. 1550-1.
142. Cai, H.Y., et al., *Preliminary study on differentiation of Leptospira grippityphosa and Leptospira sejroe from other common pathogenic leptospiral serovars in canine urine by polymerase chain reaction assay*. J Vet Diagn Invest, 2002. 14(2): p. 164-8.
143. Cai, C.S., et al., *Development of O-antigen gene cluster-specific PCRs for rapid typing six epidemic serogroups of Leptospira in China*. BMC Microbiol, 2010. 10: p. 67.
144. Smythe, L.D., et al., *A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic Leptospira spp*. BMC Infect Dis, 2002. 2: p. 13.
145. Ahmed, A., et al., *Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic leptospira species in clinical materials*. PLoS One, 2009. 4(9): p. e7093.
146. Villumsen, S., et al., *Novel TaqMan(R) PCR for detection of Leptospira species in urine and blood: pit-falls of in silico validation*. J Microbiol Methods, 2012. 91(1): p. 184-90.
147. Thaipadungpanit, J., et al., *Diagnostic accuracy of real-time PCR assays targeting 16S rRNA and lipL32 genes for human leptospirosis in Thailand: a case-control study*. PLoS One, 2011. 6(1): p. 1-5.
148. Slack, A., et al., *Evaluation of a modified Taqman assay detecting pathogenic Leptospira spp. against culture and Leptospira-specific IgM enzyme-linked immunosorbent assay in a clinical environment*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2007. 57(4): p. 361-6.
149. Gravekamp, C., et al., *Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers*. J Gen Microbiol, 1993. 139(8): p. 1691-700.
150. Merien, F., et al., *A rapid and quantitative method for the detection of Leptospira species in human leptospirosis*. FEMS Microbiol Lett, 2005. 249(1): p. 139-47.

151. Merien, F., et al., *Polymerase chain reaction for detection of Leptospira spp. in clinical samples*. J Clin Microbiol, 1992. 30(9): p. 2219-24.
152. Levett, P.N., et al., *Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR*. J Med Microbiol, 2005. 54(Pt 1): p. 45-9.
153. Perez, J. and C. Goarant, *Rapid Leptospira identification by direct sequencing of the diagnostic PCR products in New Caledonia*. BMC Microbiol, 2010. 10: p. 325.
154. Cerqueira, G.M., et al., *Bioinformatics describes novel Loci for high resolution discrimination of leptospira isolates*. PLoS One, 2010. 5(10).
155. Stoddard, R.A., et al., *Detection of pathogenic Leptospira spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2009. 64(3): p. 247-55.
156. Branger, C., et al., *Polymerase chain reaction assay specific for pathogenic Leptospira based on the gene hap1 encoding the hemolysis-associated protein-1*. FEMS Microbiol Lett, 2005. 243(2): p. 437-45.
157. Yang, C.W., et al., *The Leptospira outer membrane protein LipL32 induces tubulointerstitial nephritis-mediated gene expression in mouse proximal tubule cells*. J Am Soc Nephrol, 2002. 13(8): p. 2037-45.
158. Merien, F., G. Baranton, and P. Perolat, *Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis*. J Infect Dis, 1995. 172(1): p. 281-5.
159. Brown, P.D., et al., *Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis*. J Med Microbiol, 1995. 43(2): p. 110-4.
160. Rojas, P., et al., *Detection and quantification of leptospires in urine of dogs: a maintenance host for the zoonotic disease leptospirosis*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2010. 29(10): p. 1305-9.
161. Hamond, C., et al., *PCR detection of leptospiral carriers among seronegative horses*. Vet Rec, 2012. 171(4): p. 105-6.
162. Midence, J.N., et al., *Effects of recent Leptospira vaccination on whole blood real-time PCR testing in healthy client-owned dogs*. J Vet Intern Med, 2012. 26(1): p. 149-52.
163. Toyokawa, T., M. Ohnishi, and N. Koizumi, *Diagnosis of acute leptospirosis*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2011. 9(1): p. 111-21.
164. Hospenthal, D.R. and C.K. Murray, *In vitro susceptibilities of seven Leptospira species to traditional and newer antibiotics*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. 47(8): p. 2646-8.

165. Griffith, M.E., D.R. Hospenthal, and C.K. Murray, *Antimicrobial therapy of leptospirosis*. *Curr Opin Infect Dis*, 2006. 19(6): p. 533-7.
166. Prescott, J., *Treatment of leptospirosis*. *Cornell Vet*, 1991. 81(1): p. 7-12.
167. Truccolo, J., et al., *Quantitative PCR assay to evaluate ampicillin, ofloxacin, and doxycycline for treatment of experimental leptospirosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002. 46(3): p. 848-53.
168. Andre-Fontaine, G., et al., *Comparison of the efficacy of three commercial bacterins in preventing canine leptospirosis*. *Vet Rec*, 2003. 153(6): p. 165-9.
169. Andre-Fontaine, G., *Canine leptospirosis--do we have a problem?* *Vet Microbiol*, 2006. 117(1): p. 19-24.
170. Wang, Z., L. Jin, and A. Wegrzyn, *Leptospirosis vaccines*. *Microb Cell Fact*, 2007. 6: p. 39.
171. Minke, J.M., et al., *Onset and duration of protective immunity against clinical disease and renal carriage in dogs provided by a bi-valent inactivated leptospirosis vaccine*. *Vet Microbiol*, 2009. 137(1-2): p. 137-45.
172. Klaasen, H.L., et al., *A novel tetravalent Leptospira bacterin protects against infection and shedding following challenge in dogs*. *Vet Rec*, 2013. 172(7): p. 181.
173. Ward, M.P., *Clustering of reported cases of leptospirosis among dogs in the United States and Canada*. *Preventive Veterinary Medicine*, 2002. 56(3): p. 215-226.
174. Arent, Z.J., et al., *Emergence of novel Leptospira serovars: a need for adjusting vaccination policies for dogs?* *Epidemiol Infect*, 2012: p. 1-6.
175. Carmichael, L.E., *Canine viral vaccines at a turning point--a personal perspective*. *Adv Vet Med*, 1999. 41: p. 289-307.
176. Klaasen, H.L., et al., *Duration of immunity in dogs vaccinated against leptospirosis with a bivalent inactivated vaccine*. *Vet Microbiol*, 2003. 95(1-2): p. 121-32.
177. Coyne, M.J., et al., *Duration of immunity in dogs after vaccination or naturally acquired infection*. *Vet Rec*, 2001. 149(17): p. 509-15.
178. Bolin, C.A. and D.P. Alt, *Use of a monovalent leptospiral vaccine to prevent renal colonization and urinary shedding in cattle exposed to Leptospira borgpetersenii serovar hardjo*. *Am J Vet Res*, 2001. 62(7): p. 995-1000.
179. Rinehart, C.L., et al., *Efficacy of vaccination of cattle with the Leptospira interrogans serovar hardjo type hardjoprajitno component of a pentavalent Leptospira bacterin against experimental challenge with Leptospira borgpetersenii serovar hardjo type hardjo-bovis*. *Am J Vet Res*, 2012. 73(5): p. 735-40.

180. Martinez, R., et al., *Efficacy and safety of a vaccine against human leptospirosis in Cuba*. Rev Panam Salud Publica, 2004. 15(4): p. 249-55.
181. Laurichesse, H., et al., *Safety and immunogenicity of subcutaneous or intramuscular administration of a monovalent inactivated vaccine against Leptospira interrogans serogroup Icterohaemorrhagiae in healthy volunteers*. Clin Microbiol Infect, 2007. 13(4): p. 395-403.
182. Brett-Major, D.M. and R.J. Lipnick, *Antibiotic prophylaxis for leptospirosis*. Cochrane Database Syst Rev, 2009(3): p. CD007342.
183. Brown, K. and J. Prescott, *Leptospirosis in the family dog: a public health perspective*. CMAJ, 2008. 178(4): p. 399-401.
184. NASPHV, *Compendium of veterinary standard precautions for zoonotic disease prevention in veterinary personnel*. J. Am. Vet. Med. Assoc, 2008. 233: p. 415-432.
185. Arbour, J., et al., *Clinical leptospirosis in three cats (2001-2009)*. J Am Anim Hosp Assoc, 2012. 48(4): p. 256-60.
186. Bryson, D.G. and W.A. Ellis, *Leptospirosis in a British domestic cat*. J Small Anim Pract, 1976. 17(7): p. 459-65.
187. Mason, R.W., S.J. King, and N.M. McLachlan, *Suspected leptospirosis in two cats*. Aust Vet J, 1972. 48(11): p. 622-3.
188. Carlos, E.R., et al., *Leptospirosis in the Philippines: feline studies*. Am J Vet Res, 1971. 32(9): p. 1455-6.
189. Agunloye, C.A. and A.S. Nash, *Investigation of possible leptospiral infection in cats in Scotland*. J Small Anim Pract, 1996. 37(3): p. 126-9.
190. Larsson, C.E., et al., *Prevalence of feline leptospirosis: serologic survey and attempts of isolation and demonstration of the agent*. Int J Zoonoses, 1984. 11(2): p. 161-9.
191. Luciani, O., *Réceptivité et sensibilité du chat aux leptospires.*, 2004, École Nationale Vétérinaire de Nantes.: France.
192. Mylonakis, M.E., et al., *Leptospiral seroepidemiology in a feline hospital population in Greece*. Vet Rec, 2005. 156(19): p. 615-6.
193. Everard, C.O., et al., *Leptospirosis in dogs and cats on the Island of Trinidad: West Indies*. Int J Zoonoses, 1979. 6(1): p. 33-40.
194. Lucke, V.M. and S.T. Crowther, *The Incidence of Leptospiral Agglutination Titres in the Domestic Cat*. Vet Rec, 1965. 77: p. 647-8.

195. Markovich, J.E., L. Ross, and E. McCobb, *The prevalence of leptospiral antibodies in free roaming cats in Worcester County, Massachusetts*. J Vet Intern Med, 2012. 26(3): p. 688-9.
196. Shophet, R., *A serological survey of leptospirosis in cats*. N Z Vet J, 1979. 27(11): p. 236, 245-6.
197. Lapointe, C., I. Plamondon, and M. Dunn, *Feline leptospirosis serosurvey from a Québec referral hospital*. Can Vet J 2013. 54: p. 497-499.
198. Fessler, J.F. and R.L. Morter, *Experimental feline leptospirosis*. Cornell Vet, 1964. 54: p. 176-90.
199. Larsson, C.E., et al., *Laboratory and clinical features of experimental feline leptospirosis*. Int J Zoonoses, 1985. 12(2): p. 111-9.
200. Shophet, R. and R.B. Marshall, *An experimentally induced predator chain transmission of Leptospira ballum from mice to cats*. Br Vet J, 1980. 136(3): p. 265-70.
201. Modric, Z., *Natural and experimental leptospirosis in the cat*. Veterinarski Arhiv, 1978. 48(3): p. 147-156.
202. Ferris, D.H. and A. R.D., *Leptospira in the feral cat*. Am J Vet Res, 1964. 26(111): p. 373-376.
203. Ress, H.G., *Leptospirosis in a cat*. New Zealand Veterinary Journal, 1964. 12: p. 64.
204. Hemsley, L., *Leptospira canicola and chronic nephritis in cats*. Vet Rec, 1956. 68: p. 300.
205. Hamilton, J.M., *Nephritis in the cat*. J Small Anim Pract, 1966. 7(6): p. 445-9.
206. Bourhy, P., et al., *Comparison of real-time PCR assays for detection of pathogenic Leptospira spp. in blood and identification of variations in target sequences*. J Clin Microbiol, 2011. 49(6): p. 2154-60.
207. Jolicoeur, H., et al., *Évaluation des densités de rats laveurs et de moufettes rayées dans le cadre des interventions de lutte contre la rage du raton laveur en Montérégie en 2006 et 2007, 2009*, Direction de l'expertise sur la faune Université Laval. Service de consultation statistique: Ministère des Ressources naturelles et de la Faune. p. 75p.
208. Schowalter, D.B., et al., *A serological survey of Leptospira interrogans serotype pomona in Alberta and Saskatchewan striped skunks and possible transmission between cattle and skunks*. Can Vet J, 1981. 22(10): p. 321-3.
209. Carpio, M., G. Wobeser, and J. Iversen, *Leptospira interrogans serotype pomona in Saskatchewan: isolation from a naturally infected striped skunk*. Can J Microbiol, 1977. 23(12): p. 1654-6.

Annexes

Annexe 1: Questionnaire

RÔLE DE LEPTOSPIRA spp COMME AGENT ÉTIOLOGIQUE DE L'INSUFFISANCE RÉNALE FÉLINE Faculté de médecine vétérinaire Université de Montréal Département des sciences cliniques Marie-Claude Blais, DMV, DACVIM, professeure adjointe en médecine interne Catherine Lapointe, DMV, DACVIM, clinicienne en urgentologie Josée Harel, M.Sc, Ph.D, professeure titulaire et directrice du GREMIP Jhoanna Rodriguez, DMV, étudiante à la maîtrise	
Date: _____	
Poids du patient (Kg): _____	
Vétérinaire référant : _____	
Type d'alimentation : Nourriture sèche <input type="checkbox"/> Nourriture humide <input type="checkbox"/> Mélange des deux <input type="checkbox"/> Est-ce que votre animal est sur une diète rénale? Oui ___ Non ___ Si oui, laquelle? _____ Est-ce que les vaccins de votre animal sont à jour? Oui ___ Non ___ Date de la dernière vaccination : _____	
Est-ce que votre chat sort à l'extérieur? oui <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/> Parfois <input type="checkbox"/> Est-ce que votre chat chasse? Oui ___ Non ___ Je ne sais pas ___	
Avez-vous d'autres animaux à la maison? Oui ___ Non ___ Si oui, précisez l'espèce et le nombre: Chat <input type="checkbox"/> Oiseau <input type="checkbox"/> Souris <input type="checkbox"/> Chien <input type="checkbox"/> Furet <input type="checkbox"/> Rat <input type="checkbox"/> Hamster <input type="checkbox"/> Gerbille <input type="checkbox"/> Autre? <input type="checkbox"/> Cochon d'inde <input type="checkbox"/> Lapin <input type="checkbox"/>	
Habitez-vous dans une zone : Urbaine <input type="checkbox"/> Rurale <input type="checkbox"/> Semi Rurale <input type="checkbox"/>	

Il y a-t-il des fermes à moins d'un kilomètre de votre domicile?		Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>
Si oui, de quelle production animale s'agit-il?:			
Porc <input type="checkbox"/>	Vache <input type="checkbox"/>	Lapin <input type="checkbox"/>	
Cheval <input type="checkbox"/>	Autre? <input type="checkbox"/>		
Est-ce que votre chat a pu être en contact avec les animaux suivants?			
Raton laveur <input type="checkbox"/>	Campagnol <input type="checkbox"/>	Mouffette <input type="checkbox"/>	
Rat <input type="checkbox"/>	Souris <input type="checkbox"/>	Autre? <input type="checkbox"/>	
Est-ce que votre chat souffre d'insuffisance rénale?			
Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>	Je ne sais pas <input type="checkbox"/>	
Si oui, la maladie rénale a été diagnostiquée il y a combien de temps :			
< 15 jours <input type="checkbox"/>	15 jours-1 mois <input type="checkbox"/>	1-3 mois <input type="checkbox"/>	3- 6 mois <input type="checkbox"/> >6 mois <input type="checkbox"/>
Est-ce que votre chat présente ou a présenté les signes suivants ?			
Augmentation de la consommation d'eau	<input type="checkbox"/>		
Augmentation de la production d'urine	<input type="checkbox"/>		
Diminution de l'appétit	<input type="checkbox"/>		
Perte de poids	<input type="checkbox"/>		
Mauvaise haleine	<input type="checkbox"/>		
Vomissements	<input type="checkbox"/> Si oui, précisez la fréquence: _____		
Diarrhée	<input type="checkbox"/>		
Abattement, léthargie	<input type="checkbox"/>		
Est-ce que il reçoit des médicaments?		Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>
Si oui, lesquels : _____			

Est-ce que votre chat a reçu des antibiotiques dans les 3 derniers mois?		Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>
Connaissez-vous son statut FIV- FeLV ?		Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>
Si oui, précisez son statut et la date du dernier test de dépistage :			
FIV :	Positif <input type="checkbox"/>	Négatif <input type="checkbox"/>	Date du dernier test : _____
FeLV :	Positif <input type="checkbox"/>	Négatif <input type="checkbox"/>	